

ANTI-CCR4 ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREFOR**Publication number:** JP2002539079T**Publication date:** 2002-11-19**Inventor:****Applicant:****Classification:****- international:**

**G01N33/532; A61K39/395; A61P25/00; A61P43/00;
C07K16/28; C12N5/10; C12N5/20; C12P21/08;
G01N33/566; G01N33/577; G01N33/532; A61K39/395;
A61P25/00; A61P43/00; C07K16/18; C12N5/10;
C12N5/20; C12P21/08; G01N33/566; G01N33/577;
(IPC1-7): C12P21/08; C07K16/28; A61K39/395;
A61P25/00; A61P43/00; C12N5/10; G01N33/532;
G01N33/566; G01N33/577**

- European: C07K16/28H**Application number:** JP20000593640T 20000114**Priority number(s):** US19990231759 19990115; WO2000US00917
20000114**Also published as:**

WO0042074 (A1)



WO0042074 (A1)



EP1144453 (A1)



EP1144453 (A1)



US7138117 (B1)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP2002539079T

Abstract of corresponding document: **WO0042074**

The present invention relates to an antibody or functional fragment thereof which binds to a mammalian (e.g., human) CC-chemokine receptor 4 (CCR4) or a portion of the receptor and blocks binding of a ligand to the receptor. The invention further relates to a method of inhibiting the interaction of a cell bearing mammalian CCR4 with a ligand thereof, and to use of the antibodies and fragments in research, therapeutic, prophylactic and diagnostic methods.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-539079

(P2002-539079A)

(43) 公表日 平成14年11月19日 (2002. 11. 19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-ド (参考)
C 0 7 K 16/28		C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 4
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 6 5
			U 4 C 0 8 5
A 6 1 P 25/00		A 6 1 P 25/00	4 H 0 4 5
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 90 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2000-593640 (P2000-593640)	(71) 出願人	ミレニアム・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成12年1月14日 (2000. 1. 14)		アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州
(85) 翻訳文提出日	平成13年7月16日 (2001. 7. 16)		ケンブリッジ、シドニー・ストリート75番
(86) 国際出願番号	P C T / U S 0 0 / 0 0 9 1 7	(72) 発明者	ウー、リーチュン
(87) 国際公開番号	W O 0 0 / 4 2 0 7 4		アメリカ合衆国 マサチューセッツ
(87) 国際公開日	平成12年7月20日 (2000. 7. 20)		01867 リーディング、オーク ストリー
(31) 優先権主張番号	0 9 / 2 3 1 , 7 5 9		ト 139
(32) 優先日	平成11年1月15日 (1999. 1. 15)	(72) 発明者	ラフィン、ナンシー
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ
			02144 サマヴィル、ウェスト ストリー
			ト 9 エイ
		(74) 代理人	弁理士 細田 芳徳
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗-CCR4抗体およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物（例えば、ヒト）C-Cケモカインレセプター4（CCR4）または該レセプターの一部に結合し、かつ該レセプターへのリガンドの結合をブロックする抗体またはその機能的断片に関する。さらに、本発明は、哺乳動物CCR4産生細胞と該CCR4のリガンドとの相互作用を阻害する方法、並びに研究、治療法、予防法及び診断法における該抗体及び断片の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳動物のC-C-ケモカインレセプター4（CCR4）または該レセプターの一部に結合し、該レセプターへのリガンドの結合を阻害する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項2】 該抗体またはその抗原結合断片がレセプターへのリガンドの結合に関連する1つ以上の機能を阻害するものである、請求項1記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項3】 哺乳動物のC-C-ケモカインレセプター4（CCR4）がヒトのC-C-ケモカインレセプター4（CCR4）である、請求項1記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項4】 抗体が：

- a) モノクローナル抗体1G1；
 - b) 1G1のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；
 - c) 哺乳動物のC-C-ケモカインレセプター4（CCR4）への結合に関して1G1と競合することができる抗体；
 - d) モノクローナル抗体2B10；
 - e) 2B10のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；
 - f) 哺乳動物のC-C-ケモカインレセプター4（CCR4）への結合に関して2B10と競合することができる抗体；
 - g) モノクローナル抗体1OE4；
 - h) 1OE4のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；
 - i) 哺乳動物のC-C-ケモカインレセプター4（CCR4）への結合に関して1OE4と競合することができる抗体；および
 - j) 哺乳動物のC-C-ケモカインレセプター4（CCR4）またはその一部に結合するものである、(a)～(i)のいずれか1つの抗原結合断片、
- からなる群より選択されるものである、請求項1記載の抗体またはその抗原結合

断片。

【請求項5】 リガンドがケモカインである、請求項1記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項6】 ケモカインが、TARC、MDC、MCP-1、MIP-1 α およびRANTESのいずれか1つ以上である、請求項5記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項7】 ATCC登録番号_____の下に寄託された1G1ハイブリドーマ細胞株。

【請求項8】 ATCC登録番号_____の下に寄託された2B10ハイブリドーマ細胞株。

【請求項9】 請求項7記載のハイブリドーマ細胞株によって産生されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項10】 請求項8記載のハイブリドーマ細胞株によって産生されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項11】 a) 哺乳動物のCC-ケモカインレセプター4 (CCR4) または該レセプターの一部に結合し、該レセプターへのリガンドの結合を阻害する、少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片、および

b) 該抗体またはその抗原結合断片と該哺乳動物のCC-ケモカインレセプター4 (CCR4) またはその一部との複合体の存在を検出するのに適した1つ以上の補助試薬、

を含有する、生物学的試料中の哺乳動物のCC-ケモカインレセプター4 (CCR4) の存在の検出に使用するための試験キット。

【請求項12】 抗体が

i) モノクローナル抗体1G1；

ii) 1G1のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；

iii) 哺乳動物のCC-ケモカインレセプター4 (CCR4) への結合に関与して1G1と競合することができる抗体；

iv) モノクローナル抗体2B10；

v) 2B10のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；

v i) 哺乳動物のCC-ケモカインレセプター4 (CCR4) への結合に関して2B10と競合することができる抗体；

v i i) モノクローナル抗体10E4；

v i i i) 10E4のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；

i x) 哺乳動物のCC-ケモカインレセプター4 (CCR4) への結合に関して10E4と競合することができる抗体；および

x) 哺乳動物のCC-ケモカインレセプター4 (CCR4) またはその一部に結合する、(i) ~ (i x) のいずれか1つの抗原結合断片、
からなる群より選択されるものである、請求項1記載の試験キット。

【請求項13】 哺乳動物のCC-ケモカインレセプター4 (CCR4) 産生細胞と、哺乳動物のCC-ケモカインレセプター4 (CCR4) または前記レセプターの一部に結合し、かつ該レセプターへのリガンドの結合を阻害する抗体またはその抗原結合断片の有効量とを接触させる工程を含む、前記リガンドと哺乳動物のCC-ケモカインレセプター4 (CCR4) 産生細胞との相互作用の阻害方法。

【請求項14】 細胞が、リンパ球、単球、顆粒球、T細胞、好塩基球、およびCCR4またはその一部をコードする組換え核酸を含有する細胞からなる群より選択されるものである、請求項13記載の方法。

【請求項15】 T細胞が、CD8+細胞、CD25+細胞、CD4+細胞およびCD45RO+細胞からなる群より選択されるものである、請求項14記載の方法。

【請求項16】 リガンドがケモカインである、請求項13記載の方法。

【請求項17】 ケモカインが、TARC、MDC、MCP-1、MIP-1αおよびRANTESのいずれか1つ以上である、請求項16記載の方法。

【請求項18】 抗体またはその抗原結合断片が；

a) モノクローナル抗体1G1；

- b) 1 G 1 のエビトープ特異性と同一または類似のエビトープ特異性を有する抗体；
 - c) 哺乳動物の C C-ケモカインレセプター 4 (C C R 4) への結合に関して 1 G 1 と競合することができる抗体；
 - d) モノクローナル抗体 2 B 1 0 ；
 - e) 2 B 1 0 のエビトープ特異性と同一または類似のエビトープ特異性を有する抗体；
 - f) 哺乳動物の C C-ケモカインレセプター 4 (C C R 4) への結合に関して 2 B 1 0 と競合することができる抗体；
 - g) モノクローナル抗体 1 0 E 4 ；
 - h) 1 0 E 4 のエビトープ特異性と同一または類似のエビトープ特異性を有する抗体；
 - i) 哺乳動物の C C-ケモカインレセプター 4 (C C R 4) への結合に関して 1 0 E 4 と競合することができる抗体；および
 - j) 哺乳動物の C C-ケモカインレセプター 4 (C C R 4) またはその一部に結合する (a) ~ (i) のいずれか 1 つの抗原結合断片、
- からなる群より選択されるものである、請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 9】 a) 細胞または試験対象の細胞の両方を含有した組成物と、哺乳動物の C C-ケモカインレセプター 4 (C C R 4) または該レセプターの一部に結合し、該レセプターへのリガンドの結合を阻害する抗体またはその抗原結合断片とを、哺乳動物の C C R 4 またはその一部への前記抗体またはその抗原結合断片の結合に適した条件下で接触させる工程；ならびに

b) 前記抗体またはその抗原結合断片の結合を検出する工程

を含み、前記抗体またはその抗原結合断片の結合が、前記細胞上での前記レセプターまたは前記レセプターの一部の存在を示す、細胞または該細胞の両方による哺乳動物の C C-ケモカインレセプター 4 (C C R 4) またはその一部の発現の検出方法。

【請求項 2 0】 抗体またはその抗原結合断片が

- i) モノクローナル抗体 1 G 1 ；

- i i) 1 G 1 のエビトープ特異性と同一または類似のエビトープ特異性を有する抗体；
 - i i i) 哺乳動物の C C-ケモカインレセプター 4 (C C R 4) への結合に関して 1 G 1 と競合することができる抗体；
 - i v) モノクローナル抗体 2 B 1 0 ；
 - v) 2 B 1 0 のエビトープ特異性と同一または類似のエビトープ特異性を有する抗体；
 - v i) 哺乳動物の C C-ケモカインレセプター 4 (C C R 4) への結合に関して 2 B 1 0 と競合することができる抗体；
 - v i i) 哺乳動物の C C-ケモカインレセプター 4 (C C R 4) またはその一部に結合する (i) ~ (v i) のいずれか 1 つの抗原結合断片；
 - v i i i) モノクローナル抗体 1 0 E 4 ；
 - i x) 1 0 E 4 のエビトープ特異性と同一または類似のエビトープ特異性を有する抗体；
 - x) 哺乳動物の C C-ケモカインレセプター 4 (C C R 4) への結合に関して 1 0 E 4 と競合することができる抗体；ならびに
 - x i) 上記の組み合わせ
- からなる群より選ばれるものである、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】 組成物がヒトの細胞を含有する試料である、請求項 2 0 記載の方法。

- 【請求項 2 2】 a) 試験対象の試料と、哺乳動物の C C-ケモカインレセプター 4 (C C R 4) または該レセプターの一部に結合し、該レセプターへのリガンドの結合を阻害する抗体またはその抗原結合断片とを、哺乳動物の C C R 4 またはその一部への前記抗体またはその断片の結合に遭した条件下で接触させる工程；ならびに
- b) 前記抗体またはその抗原結合断片の結合を検出または測定する工程
- を含み、試料中における物質への前記抗体またはその抗原結合断片の結合が、前記試料中における哺乳動物の C C-ケモカインレセプター 4 (C C R 4) または該レセプターの一部の存在を示す、哺乳動物の C C-ケモカインレセプター 4 (

CCR4)または該レセプターの一部の検出方法。

【請求項23】 抗体またはその抗原結合断片が、

i)モノクローナル抗体1G1;

ii)1G1のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体;

iii)哺乳動物のCCR4-ケモカインレセプター4(CCR4)への結合に関して1G1と競合することができる抗体;

iv)モノクローナル抗体2B10;

v)2B10のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体;

vi)哺乳動物のCCR4-ケモカインレセプター4(CCR4)への結合に関して2B10と競合することができる抗体;

vii)モノクローナル抗体10E4;

viii)10E4のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体;

ix)哺乳動物のCCR4-ケモカインレセプター4(CCR4)への結合に関して10E4と競合することができる抗体;

x)哺乳動物のCCR4-ケモカインレセプター4(CCR4)またはその一部に結合する(i)~(ix)のいずれか1つの抗原結合断片;および

xi)上記の組み合わせ

からなる群より選ばれる、請求項22記載の方法。

【請求項24】 試料が、正常個体における哺乳動物のCCR4-ケモカインレセプター4(CCR4)または該レセプターの一部を含有してなる細胞の画分である、請求項22記載の方法。

【請求項25】 哺乳動物のCCR4-ケモカインレセプター4(CCR4)または該レセプターの一部に結合する抗体またはその抗原結合断片の有効量と、前記レセプターまたはその一部を含有する組成物とを接触させる工程を含み、該抗体または断片が前記ケモカインの哺乳動物のCCR4-ケモカインレセプター4(CCR4)への結合を阻害し、かつケモカインの前記レセプターへの結合に関連す

る1以上の機能を阻害する、哺乳動物のC-Cケモカインレセプター4（CCR4）または前記レセプターの機能性断片へのケモカインの結合に関連する機能の阻害方法。

【請求項26】 ケモカインが、TARC、MDC、MCP-1、MIP-1 α およびRANTESのいずれか1つ以上である、請求項25記載の方法。

【請求項27】 抗体またはその抗原結合断片が：

- a) モノクローナル抗体1G1；
 - b) 1G1のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；
 - c) 哺乳動物のC-Cケモカインレセプター4（CCR4）への結合に関して1G1と競合することができる抗体；
 - d) モノクローナル抗体2B10；
 - e) 2B10のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；
 - f) 哺乳動物のC-Cケモカインレセプター4（CCR4）への結合に関して2B10と競合することができる抗体；
 - g) モノクローナル抗体1OE4；
 - h) 1OE4のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；
 - i) 哺乳動物のC-Cケモカインレセプター4（CCR4）への結合に関して1OE4と競合することができる抗体；および
 - j) 哺乳動物のC-Cケモカインレセプター4（CCR4）またはその一部に結合する（a）～（i）のいずれか1つの抗原結合断片、
- からなる群より選択されるものである、請求項25記載の方法。
- 【請求項28】 a) 試験対象の試薬、
- b) 哺乳動物のC-Cケモカインレセプター4（CCR4）または該レセプターの一部に結合し、リガンドの該レセプターへの結合を阻害する、抗体または抗原結合断片；並びに
 - c) 哺乳動物のC-Cケモカインレセプター4（CCR4）またはそのリガンド

結合バリエントを含有する組成物

を、前記哺乳動物のＣＣ－ケモカインレセプター４（ＣＣＲ４）またはそのリガンド結合バリエントへの前記抗体または抗原結合断片の結合、および前記哺乳動物のＣＣ－ケモカインレセプター４（ＣＣＲ４）またはそのリガンド結合バリエントへの前記抗体または抗原結合断片の結合を検出または測定するのに適した条件下で混合する（combining）工程を有する、哺乳動物のＣＣ－ケモカインレセプター４（ＣＣＲ４）またはそのリガンド結合バリエントに結合する試薬の検出または同定方法。

【請求項２９】 抗体またはその抗原結合断片が：

- a) モノクローナル抗体１Ｇ１；
 - b) １Ｇ１のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；
 - c) 哺乳動物のＣＣ－ケモカインレセプター４（ＣＣＲ４）への結合に関して１Ｇ１と競合することができる抗体；
 - d) モノクローナル抗体２Ｂ１０；
 - e) ２Ｂ１０のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；
 - f) 哺乳動物のＣＣ－ケモカインレセプター４（ＣＣＲ４）への結合に関して２Ｂ１０と競合することができる抗体；
 - g) モノクローナル抗体１０Ｅ４；
 - h) １０Ｅ４のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；
 - i) 哺乳動物のＣＣ－ケモカインレセプター４（ＣＣＲ４）への結合に関して１０Ｅ４と競合することができる抗体；
 - j) 哺乳動物のＣＣ－ケモカインレセプター４（ＣＣＲ４）またはその一部に結合する（a）～（i）のいずれか１つの抗原結合断片；および
 - k) 上記の組み合わせ
- からなる群より選択されるものである、請求項２８記載の方法。

【請求項３０】 前記抗体または抗原結合断片と前記哺乳動物のＣＣ－ケモ

カインレセプター4（CCR4）またはリガンド結合バリエーションとの複合体の形成をモニターし、かつ適切な対照と比較して形成された複合体の量における減少が、薬剤が前記レセプターまたはそのリガンド結合バリエーションに結合することを示す、請求項28記載の方法。

【請求項31】 哺乳動物のC-Cケモカインレセプター4（CCR4）またはそのリガンド結合バリエーションを含有してなる組成物が、組換えC-Cケモカインレセプター4（CCR4）またはそのリガンド結合バリエーションを産生する細胞である、請求項28記載の方法。

【請求項32】 哺乳動物のC-Cケモカインレセプター4（CCR4）またはそのリガンド結合バリエーションを含有してなる組成物が、前記の組換えC-Cケモカインレセプター4（CCR4）またはそのリガンド結合バリエーションを産生する細胞の膜成分である、請求項28記載の方法。

【請求項33】 抗体またはその抗原結合断片が、放射性同位体、スピン標識、抗原標識、酵素標識、蛍光性基および化学発光基からなる群より選択される標識で標識される、請求項28記載の方法。

【請求項34】 薬剤が、哺乳動物のC-Cケモカインレセプター4（CCR4）またはその抗原結合断片に対する特異性を有する抗体である、請求項28記載の方法。

【請求項35】 哺乳動物のC-Cケモカインレセプター4（CCR4）または該レセプターの一部に結合する抗体またはその抗原結合断片であり、かつレセプターへのリガンドの結合を阻害する抗体またはその抗原結合断片の有効量を含有する組成物を患者に投与する工程を含む、患者における白血球輸送（trafficking）の阻害方法。

【請求項36】 リガンドがケモカインである、請求項35記載の方法。

【請求項37】 ケモカインが、TARC、MDC、MCP-1、MIP-1αおよびRANTESのいずれか1つ以上である、請求項36記載の方法。

【請求項38】 抗体またはその抗原結合断片が：

- a) モノクローナル抗体1G1；
- b) 1G1のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗

体；

c) 哺乳動物のCＣ－ケモカインレセプター４（CCR４）への結合に関して1 G1と競合することができる抗体；

d) モノクローナル抗体2B10；

e) 2B10のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；

f) 哺乳動物のCＣ－ケモカインレセプター４（CCR４）への結合に関して2 B10と競合することができる抗体；

g) モノクローナル抗体10E4；

h) 10E4のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体；

i) 哺乳動物のCＣ－ケモカインレセプター４（CCR４）への結合に関して1 0E4と競合することができる抗体；および

j) 哺乳動物のCＣ－ケモカインレセプター４（CCR４）またはその一部に結合する（a）～（i）のいずれか1つの抗原結合断片

からなる群より選択されるものである、請求項35記載の方法。

【請求項39】 哺乳動物のCＣ－ケモカインレセプター４（CCR４）または前記レセプターの一部に結合し、該レセプターへのリガンドの結合を阻害する抗体またはその抗原結合断片、および任意に薬学的に許容され得るベヒクルを含有してなる組成物。

【請求項40】 哺乳動物のCＣ－ケモカインレセプター４（CCR４）または該レセプターの一部に結合し、約1、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のIC₅₀で該レセプターへのリガンドの結合を阻害する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項41】 哺乳動物のCＣ－ケモカインレセプター４（CCR４）または該レセプターの一部に結合し、約1、5 ng/ml 未満のIC₅₀で該レセプターへのリガンドの結合を阻害する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項42】 哺乳動物のCＣ－ケモカインレセプター４（CCR４）またはその一部に結合する抗体またはその抗原結合断片の有効量を患者に投与する工程を含む、患者のCＣ－ケモカインレセプター４（CCR４）媒介性障害の治

療方法。

【請求項43】 哺乳動物のＣＣ－ケモカインレセプター４（ＣＣＲ４）またはその一部に結合する抗体またはその抗原結合断片の有効量を患者に投与する工程を含む、患者の炎症性障害の治療方法。

【請求項44】 ATCC登録番号_____の下に寄託された１０Ｅ４ハイブリドーマ細胞株。

【請求項45】 請求項44記載のハイブリドーマ細胞株によって産生されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本願は、1999年1月15日に出願した米国出願番号09/231,759号の一部継続出願であり、その教示は参照により全て本明細書に組み込まれる。

【0002】

発明の背景技術

ケモカインはほとんど全ての白血球型に作用する数多くの炎症誘発活性を持つことから、過去10年の間に、重要な炎症メディエーターとして注目を集めるようになった。また最近ケモカインは、正常な免疫監視と免疫応答ならびに造血、血管新生、ウイルス感染の制御およびT細胞分化における他のいくつかの機能に不可欠な基礎的な白血球の輸送(trafficking)の重要な成分として認識されるようになった(Baggioliniら, Ann. Rev. Immunol. 15:675(1997); Zouら, Nature 393:595(1998); Tachibanaら, Nature 393:591(1998))。化学走性、脱顆粒、脂質メディエーターの合成およびインテグリン活性化の誘因などといった白血球に対する一定の範囲の炎症誘発効果の媒介を含むこの多種多様な生物学的活性は、炎症性疾患の開始と維持にそれらが果たす重要な役割および一定のケモカインレセプターがHIV-1侵入の補助レセプターとして最近同定されたことと合わせて、ケモカインおよびケモカインレセプターを魅力的な新しい治療標的群にしている。

【0003】

ケモカインファミリーのメンバーはIL-1 β やTNF α などの初期の炎症メディエーターにตอบสนองして多くの細胞型によって産生され分泌される。ケモカインスーパーファミリーは2つの主要なブランチ、すなわち最初の2つのシステインの間に1つのアミノ酸が挿入されていることを特徴とする α -ケモカイン(すなわちCXCKケモカイン)と、隣接した2つのシステインを含有する β -ケモカイン(CCケモカイン)を含む。 α -ケモカインのブランチにはIL-8、好中球活性化ペプチド-2(NAP-2)、黒色腫成長刺激活性(MGSA/gro

たはGRO α) およびENA-78などのタンパク質が含まれ、これらのタンパク質はそれぞれ主として好中球に対する誘引および活性化効果を持つ。 β -ケモカインのブランチのメンバーは単球、リンパ球、好塩基球および好酸球などといった他の細胞型に作用し (Oppenheim, J. J. ら, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:617-648 (1991); Baggiolini, M. ら, *Adv. Immunol.*, 55:97-179 (1994); Miller および Krangel, *Crit. Rev. Immunol.*, 12:17-46 (1992); Jose, P. J. ら, *J. Exp. Med.*, 179:881-118 (1994); Ponath, P. D. ら, *J. Clin. Invest.*, 97:604-612 (1996))、そして、単球の化学走性タンパク質1~4 (MCP-1, MCP-2, MCP-3 および MCP-4)、RANTES、マクロファージ炎症性タンパク質 (MIP-1 α , MIP-1 β)、胸腺および活性化制御されたケモカイン (thymus and activation-regulated chemokine) (TARC; Imai ら, *J. Biol. Chem.* 271:21514-21521 (1996)) およびマクロファージ由来ケモカイン (MDC; Godiska ら, *J. Exp. Med.* 185:1595-1604 (1997)) などのタンパク質を含む。

【0004】

ケモカインは7回膜貫通型Gタンパク質共役レセプターに結合する (Murphy, P. M., *Annu. Rev. Immunol.*, 12:593-633 (1994))。現在までに多くの β -ケモカインレセプター (CCR1~CCR10) が同定されており、さらなるケモカインレセプターの探索が活発な研究の対象になっている (Baggiolini, *Nature* 392:565-568 (1998))。ケモカインレセプターCCR4はPower ら (*J. Biol. Chem.* 270:19495-19500 (1995); Genbank 登録番号X85740) とMeyer ら (*J. Biol. Chem.* 271(24):14445-14451 (1996); Genbank 登録番号X94151) によって同定された。ヒトCCR4のネズミのホモログも同定さ

れている (Younら, Blood 89 (12) : 4448-4460 (1997))。当初CCR4はMCP-1、MIP-1 α とRANTESに反応してシグナル伝達することが見出されたが、最近になってケモカインTARCおよびMDCに特異的であることが明らかになった (Imaiら, J. Biol. Chem. 272 (23) : 15036-15042 (1997) ; Imaiら, J. Biol. Chem. 278 : 1764-1768 (1998))。

【0005】

炎症部位への白血球サブセットの選択的な補充と、循環系、組織、リンパ系および二次リンパ系器官を通した白血球の規則正しい輸送は、幾分、細胞のサブセットでのケモカインレセプターの差次的発現によって制御される。このような発現パターンは機能的に関連した一群の白血球が与えられた刺激によって誘導される特定のケモカイン群に対して協調的に応答できることを保証しているようである。T細胞の場合、PCRまたはノーザンブロット法により、CCケモカインの既知のレセプターがT細胞のサブセット上に発現することが示される。どのサブセットが特定のレセプターを発現するかを正確に記述する作業は熾烈な研究分野になっている。なぜならケモカインレセプター発現はTH1もしくはTH2 T細胞または組織ホーミングサブセットなどの様々な細胞型の局在または遊走の説明になるかもしれないからである。また、これはHIV-1の様々な株にどのT細胞が感染されるかを決定するかもしれない。しかしほとんどの白血球は数種類のケモカインレセプターを発現し、その多くは複雑に入り交じったリガンド相互作用を伴う。これが、所定の細胞型上の特定のレセプターに関する正常な免疫機能の解明ならびに疾患の開始および進行との関連性の決定を困難にしている。それは特に、多くのケモカインレセプターで、特異的抗体が利用できないからである。

【0006】

発明の要約

本発明は、哺乳動物のCCケモカインレセプター4 (CCR4、CCR-4、TARCレセプターおよびMDCレセプターともいう) または該レセプターの一部に結合する抗体 (免疫グロブリン) またはその機能的断片 (例えば抗原結合断

片) (抗-CCR4) に関する。一実施態様において、本発明の抗体またはその断片はヒトCCR4またはその一部に対する特異性を有する。もう一つの実施態様において、本発明の抗体または断片は、上記レセプターに対するリガンド (例えばTARC、MDC、MCP-1、MIP-1 α 、RANTES) の結合をブロックし、前記レセプターに対するリガンドの結合に関連する1つ以上の機能 (例えば白血球の輸送) を阻害する。好ましい実施態様では、そのリガンドがTARCおよび/またはMDCである。例えば本明細書に記載するようにヒトCCR4またはその一部を結合する本発明の抗体とその断片は、レセプターに対するケモカイン (例えばTARC、MDC、MCP-1、MIP-1 α 、RANTES) の結合をブロックし、レセプターに対するケモカインの結合に関連する機能を阻害することができる。好ましい実施態様では、ケモカインはTARCおよび/またはMDCである。一実施態様において、抗体はモノクローナル抗体 (mAb) LS141-1G1 (1G1) であるか、ヒトCCR4またはヒトCCR4の一部に対する結合に関して1G1と競合できる抗体である。もう一つの実施態様において、抗体はモノクローナル抗体 (mAb) LS185-2B10 (2B10) であるか、ヒトCCR4またはヒトCCR4の一部に対する結合に関して2B10と競合できる抗体である。もう一つの実施態様において、抗体はモノクローナル抗体 (mAb) LS257-10E4 (10E4) であるか、ヒトCCR4またはヒトCCR4の一部に対する結合に関して10E4と競合できる抗体である。上述した抗体の機能的断片も考えられる。

【0007】

また本発明は、哺乳動物のCCR4またはそのレセプターの一部に結合し、他の抗-CCR4抗体と比較してCCR4またはCCR4含有組成物の増大した蛍光染色強度を与える抗体またはその機能的断片 (例えば抗原結合断片) に関する。一実施態様において、抗体はモノクローナル抗体1G1、2B10もしくは10E4、またはヒトCCR4もしくはヒトCCR4の一部に対する結合に関して1G1、2B10もしくは10E4と競合できる抗体である。

【0008】

さらに本発明は、細胞が保有している哺乳動物 (例えばヒト、ヒト以外の霊長

類またはネズミ)のCCR4とそのリガンドとの相互作用を阻害する方法に関する。この方法は、上記細胞を哺乳動物のCCR4もしくはCCR4の一部に結合する抗体もしくはその機能的断片の有効量と接触させる工程を包含する。適切な細胞としては顆粒球、白血球(単球、マクロファージ、好塩基球および好酸球など)、およびマスト細胞、Th1細胞やTh2細胞などのT細胞を含むリンパ球(例えばCD8+細胞、CD4+細胞、CD25+細胞、CD45RO+細胞)ならびにCCR4を発現する組換え細胞(例えばトランスフェクト細胞)のような、CCR4またはその一部を発現する他の細胞などが挙げられる。ある特定の態様では、抗体は1G1、2B10もしくは10E4、またはヒトのCCR4もしくはヒトのCCR4の一部に対する結合に関して1G1、2B10もしくは10E4と競合できる抗体である。

【0009】

本発明の別の態様は、哺乳動物のCCR4産生細胞とケモカインとの相互作用を阻害する方法に関する。この方法は、上記細胞をCCR4または上記レセプターの一部に結合する抗体またはその機能的断片の有効量と接触させる工程を包含する。本方法の実施態様では、上記の抗体またはその機能的断片は、任意の1つ以上の、1G1、2B10もしくは10E4、または1G1、2B10もしくは10E4の抗原結合断片、または1G1、2B10もしくは10E4と同一もしくは類似のエピトープ特異性を有する抗体もしくはその断片である。さらに本発明は、CCR4に対するケモカインの結合に関連する機能を阻害する方法に関する。この方法は、哺乳動物のCCR4または上記レセプターの一部に結合する抗体またはその機能的断片の有効量を投与する工程を包含する。この方法の1つの局面において、上記の抗体またはその機能的断片は、任意の1つ以上の、1G1、2B10もしくは10E4、または1G1、2B10もしくは10E4の抗原結合断片、または1G1、2B10もしくは10E4のものと同じもしくは類似のエピトープ特異性を有する抗体もしくはその断片である。

【0010】

本発明の別の局面は、細胞による哺乳動物のCCR4またはこのレセプターの一部の発現を同定する方法である。この方法では、細胞またはその画分(例えば

膜画分)を含む組成物を、哺乳動物のCCR4タンパク質またはこのレセプターの一部に結合する抗体またはその機能的断片(例えば1G1、2B10または10E4)と、それに対する抗体の結合に適した条件で接触させ、そして該抗体または断片と該タンパク質またはその一部との複合体の形成が検出される。複合体の検出は、直接的または間接的に、上記細胞またはその画分上に上記レセプターまたはその一部が存在することを示す。また、本発明は生物学的試料中のCCR4またはその一部の存在を検出することにおける使用のためのキットに関する。このキットは、哺乳動物のCCR4または上記レセプターの一部に結合する抗体またはその機能的断片と、該抗体または断片と該タンパク質またはその一部との複合体の存在を検出するのに適した1つ以上の補助試薬を含む。

【0011】

また本発明は、哺乳動物のCCR4機能の阻害物質および/または促進物質を含む哺乳動物のCCR4タンパク質に結合するさらなるリガンドまたは他の物質を同定する方法も包含する。例えば、本発明の抗体またはその機能的断片のものと同一または類似の結合特異性を有する試薬が、上記抗体または断片を用いる競合アッセイによって同定できる。したがって、本発明は、レセプター機能の阻害物質(例えばアンタゴニスト)または促進物質(例えばアゴニスト)を含むCCR4レセプターに結合するリガンドまたは他の基質を同定する方法も包含する。一実施態様において、CCR4レセプタータンパク質を天然に発現する細胞、または細胞内に導入された核酸によってコードされるCCR4レセプターもしくはバリエーションを発現するように操作されている適当な宿主細胞を、リガンド、レセプター機能の阻害物質または促進物質を同定し、その効力を評価するためのアッセイにおいて使用する。このような細胞は発現されたレセプタータンパク質またはポリペプチドの機能を評価することにおいて有用である。

【0012】

したがって、本発明は哺乳動物のCCR4またはそのリガンド結合性バリエーションに結合する試薬を検出するまたは同定する方法に関する。この方法は、試験される試薬、本発明の抗体または抗原結合断片(例えばモノクローナル抗体1G1、モノクローナル抗体2B10もしくはモノクローナル抗体10E4、または1

G1、2B10もしくは10E4と同一または類似のエピトープ特異性を持つ抗体、または1G1、2B10もしくは10E4の抗原結合断片)および哺乳動物のCCR4タンパク質またはそのリガンド結合性バリエーションを含有する組成物を混合する工程を包含する。上記の成分は哺乳動物のCCR4タンパク質またはそのリガンド結合性バリエーションに対する上記抗体または抗原結合断片の結合に適した条件下で混合することができ、哺乳動物のCCR4タンパク質またはリガンド結合性バリエーションに対する上記抗体または断片の結合が、本明細書に記載の方法または他の適切な方法に従って直接的または間接的に検出もしくは測定される。適切な対照(例えば試験される試薬の不在下)と比較した複合体形成量の減少は、その試薬が上記レセプターまたはバリエーションに結合することの指標である。哺乳動物のCCR4タンパク質またはそのリガンド結合性バリエーションを含有する組成物は、組換えCCR4タンパク質またはそのリガンド結合性バリエーションを産生する細胞の膜画分であり得る。抗体またはその断片は放射性同位体、スピン標識、抗原標識、酵素標識、蛍光基および化学発光基などの標識で標識することができ、これらのアッセイおよび類似のアッセイは、CCR4を結合し、レセプターへの結合に関して本明細書に記載の抗体と競合できる物質、例えばリガンド(例えば、CCR4と相互作用するケモカイン)またはレセプター機能の阻害物質もしくは促進物質を含めた他の基質などを検出するために使用できる。

【0013】

本発明によればリガンド、レセプター機能の阻害物質または促進物質を適切なアッセイで測定し、さらにそれらを治療効果について評価することができる。レセプター機能の阻害物質はレセプター活性を阻害(減少または防止)するために使用でき、リガンドおよび/または促進物質は正常なレセプター機能を必要に応じて誘導する(惹起するまたは増進する)ために使用できる。本発明は、炎症性疾患、自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症および移植片拒絶またはHIV感染症の治療方法を提供する。この方法は、レセプター機能(例えばケモカインの結合またはHIVの結合)の阻害物質を個体(例えばヒトなどの哺乳動物)に投与する工程を包含する。さらに本発明は新規リガンドまたは促進物質を個体に投与することによってレセプター機能を刺激する方法を提供する。これは例えば感

染性疾患や癌の治療などに役立つ、白血球の機能を選択的に刺激するための新規の手がかりを提供する。

【0014】

また本発明は患者における白血球の輸送を阻害する方法も含む。この方法は、哺乳動物のCCR4またはレセプターの一部に結合してそのレセプターに対するリガンドの結合に関連する機能を阻害する抗体またはその機能的断片の有効量を患者に投与する工程を包含する。

【0015】

また、本発明は、炎症性障害などのCCR4が媒介する障害を抑制または治療する方法に関する。この方法は、哺乳動物のCCR4またはレセプターの一部に結合してCCR4が媒介する機能を阻害する抗体またはその機能的断片の有効量を患者に投与する工程を包含する。

【0016】

さらに本発明は、治療（予防を含む）または診断における使用のため本明細書に記載の抗体もしくはその断片（例えば、モノクローナル抗体1G1、モノクローナル抗体2B10もしくはモノクローナル抗体10E4、または1G1、2B10もしくは10E4の抗原結合断片、または1G1、2B10もしくは10E4のものと同一または類似のエピトープ特異性を持つ抗体）ならびにCCR4が媒介する障害または本明細書に記載の他の疾患もしくは炎症状態を処置するための医薬品を製造するための上記抗体または断片の使用に関する。

【0017】

発明の詳細な説明

本発明は、哺乳動物のCCケモカインレセプター4（CCR4、CKR-4、TARCレセプターもしくはMDCレセプター）またはCCR4の一部に結合する抗体（抗CCR4）またはその機能的断片に関する。一実施態様において、抗体はヒトCCR4またはその一部に対する特異性を有する。一実施態様において、抗体（免疫グロブリン）は単離されたおよび／または組換えの哺乳動物のCCR4またはその一部（例えば、ペプチド）に対してあるいは、哺乳動物のCCR4を発現する宿主細胞に対して産生される。好ましい一実施態様において、抗

体は、ヒトCCR4レセプターまたはその一部に特異的に結合し、また特に好ましい実施態様において、抗体は天然に存在するか、または内因性のヒトのCCR4に対して特異性を有する。哺乳動物のCCR4に特有の1つ以上の機能、例えば結合活性（例えば、リガンド、阻害物質および/または促進物質の結合）、シグナル伝達活性（例えば、哺乳動物のGタンパク質の活性化、細胞質ゾルの遊離カルシウム濃度 $[Ca^{2+}]_i$ の急速でそして一時的な増大の誘導）および/または細胞性の応答の刺激（例えば、化学走性の刺激、エキソサイトーシスまたは白血球による炎症メディエーターの放出、インテグリン活性化）などを阻害できる抗体またはその機能的断片も本発明に包含される。この抗体は、CCR4に対するリガンド（すなわち1つ以上のリガンド）の結合および/またはリガンドに反応してCCR4によって媒介される1つ以上の機能を阻害できる。例えば、一つの局面においては、抗体またはその機能的断片は、レセプターと、MDC、TARC、MCP-1、MIP-1 α またはRANTESなどの天然リガンドとの相互作用を阻害（減少または防止）し得る。ある態様では、そのリガンドはTARCおよび/またはMDCである。別の局面においては、CCR4に結合する抗体またはその機能的断片は、哺乳動物のCCR4（例えばヒトのCCR4、ヒト以外の霊長類のCCR4、ネズミのCCR4、モルモット起源のCCR4）に対するTARC、MDC、MCP-1、MIP-1 α および/またはRANTESの結合を阻害し得る。本発明の抗体またはその機能的断片は、例えば白血球の輸送、T細胞の活性化、炎症メディエーターの放出および/または白血球の脱顆粒を含む、ヒトのCCR4によって媒介される機能を阻害し得る。ある特定の態様では抗体またはその機能的断片がケモカインによって誘発される（例えばTARCまたはMDCによって誘発される）細胞の化学走性の阻害を、好ましくは約0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、好ましくは約0.30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満、より好ましくは約0.27 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満で示す。

【0018】

本発明のさらなる実施態様において、本発明の抗体またはその機能的断片は、CCR4に対するCCR4リガンド（例えばケモカイン）の結合を、好ましくは約1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のIC₅₀で阻害できる。別の実施態様において、本発明

の抗体またはその機能的断片はCCR4に対するCCR4リガンド（例えばケモカイン）の結合を約1.5 ng/ml未満のIC₅₀で阻害できる。

【0019】

CCR4に対して特異的なネズミモノクローナル抗体（1G1、2B10および10E4と命名した）を本明細書に記載するように産生させた。好ましい実施態様において、本発明の抗体はヒトのCCR4に結合し、本明細書に記載のネズミの1G1、2B10または10E4抗体のものと同一もしくは類似のエピトープ特異性を有する。ネズミの1G1モノクローナル抗体のものと同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体は、ヒトCCR4（例えば、ヒトのCCR4産生細胞（例えば、CCRを産生するトランスフェクタント、CD8+細胞、CD4+細胞、CD45RO+細胞、CD25+細胞、半球、樹状細胞、マクロファージおよび好塩基球））に対する結合に関してネズミの1G1モノクローナル抗体と競合するそれらの能力によって同定できる。同様に、ネズミの2B10または10E4モノクローナル抗体のものと同一もしくは類似のエピトープ特異性を持つ抗体は、ヒトのCCR4に対する結合に関してそれぞれネズミの2B10または10E4モノクローナル抗体と競合するそれらの能力によって同定できる。レセプターのキメラ（例えば、Ruckerら, Cell 87:437-446（1996）に記載されているもの）を使用することにより、mAb 1G1、2B10および10E4のCCR4結合部位（すなわちエピトープ特異性）をマッピングすることができる。あるいは、CCR4の特定のアミノ酸配列を持つペプチドを競合アッセイに使用して所定の抗体への結合に関してCCR4と競合できるペプチドを同定するペプチドブロック法を用いて、抗体のエピトープ特異性を評価することもできる。CCR4と競合できるペプチドをさらに評価することで、所定の抗体が結合するCCR4エピトープをさらに詳しく規定することができる。これらの技術または他の適切な技術を使用することにより、本発明の抗体のものと同一または類似のエピトープ特異性を持つ抗体を同定できる。

【0020】

また本発明は、本明細書に記載の抗体のうち少なくとも2種類と同一または類似のエピトープ特異性を持つ二重特異性抗体またはその機能的断片（例えばF（

ab')_g)に関する(例えば、米国特許第5,141,736号(Iwasara)、米国特許第4,444,878号、第5,292,668号、第5,523,210号(以上Paulusら)および米国特許第5,496,549号(Yamazakiら)を参照されたい)。例えば本発明の二重特異性抗体はmAb 1G1および2B10、mAb 1G1並びに10E4、またはmAb 2B10および10E4と同一もしくは類似のエピトープ特異性を有し得る。

【0021】

本発明の抗体を産生するネズミハイブリドーマ細胞株は、1999年1月6日にLeukoSite, Inc., 215 First Street, Cambridge, MA 02142, U. S. A. を代表してアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)、10801, University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, U. S. A. に、登録番号HB-12624 (LS141-1G1-65-15-1 (1G1)) およびHB-12625 (LS185-2B10-4-1 (2B10)) で寄託された。本発明のさらなる抗体を産生するネズミハイブリドーマ細胞株は、2000年1月14日にLeukoSite, Inc., 215 First Street, Cambridge, MA 02142, U. S. A. を代表してアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801, University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, U. S. A. に、登録番号_____ (LS257-10E4. 1. 1 (10E4)) で寄託された。本発明はまた、ATCC登録番号HB-12624、ATCC登録番号HB-12625、およびATCC登録番号_____の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株、ならびにATCC登録番号HB-12624、HB-12625およびATCC登録番号_____の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体に関する。

【0022】

本発明の抗体はポリクローナルであってもモノクローナルであってもよく、「抗体」という用語はポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方を含む

ことが意図される。さらにまた、1 G 1 を利用する本明細書に記載の方法では1 G 1 の機能的断片（例えば抗原結合断片）、1 G 1 と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体およびそれらの組み合わせも、必要であれば1 G 1 とは同じでなく類似してもいいエピトープ特異性を持つ抗体または断片と組み合わせ使用できる；同様に、2 B 1 0 を利用すると記載されている方法では、2 B 1 0 の機能的断片、2 B 1 0 と同一または類似のエピトープ特異性を持つ抗体およびそれらの組み合わせも、必要であれば2 B 1 0 とは同じでなく類似してもいいエピトープ特異性を持つ抗体または断片と組み合わせ使用することもできることが理解される。1 0 E 4 を使用すると記載される方法では、1 0 E 4 の機能的断片、1 0 E 4 と同一または類似のエピトープ特異性を持つ抗体およびそれらの組み合わせも、必要であれば1 0 E 4 とは同じでなく類似してもいいエピトープ特異性を持つ抗体または断片と組み合わせ使用することもできる。本発明の抗体は適当な免疫原（例えば単離および／または組換えの哺乳動物の C C R 4 タンパク質もしくはその一部）または合成分子（例えば、合成ペプチド）に対して産生させることができる。好ましい実施態様において、レセプターを発現する細胞（例えばトランスフェクト細胞）は免疫原としてまたはレセプターに結合する抗体のスクリーニングに使用され得る。

【0023】

本発明の抗体およびその断片は、本明細書に記載するように治療適用、診断適用および研究適用において有用である。本発明は、治療（予防を含む）または（例えば本明細書に記載するような特定の疾患または状態の）診断に使用するための、および本明細書に記載するような疾患または状態の治療に使用するための医薬品の製造における本発明の抗体またはその機能的部分（例えばmAb 1 G 1、2 B 1 0 もしくは1 0 E 4 またはその抗原結合断片）の使用を包含する。

【0024】

免疫化抗原の調製とポリクローナルおよびモノクローナル抗体の産生は本明細書に記載のようにまたは他の適当な技術を使って行なうことができる。様々な方法が記載されている（例えばKöhlerら、Nature, 256:495-497 (1975) およびEur. J. Immunol. 6:511-519

(1976); Milsteinら, Nature 266:550-552
(1997); Koprowskiら, 米国特許第4, 172, 124号; Harlow, E. および D. Lane (1998) Antibodies: A Laboratory Manual (コールドスプリングハーバー研究所, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー); Ausubel, F. M. ら編, Current Protocols In Molecular Biology Vol. 2 (Supplement 27, 1994年夏) (John Wiley & Sons, ニューヨーク州ニューヨーク)のChapter 11 (1991)などを参照されたい。一般にハイブリドーマは適当な不死化細胞株(例えばSP2/Oなどの骨髓腫細胞株)を抗体産生細胞と融合させることによって産生され得る。抗体産生細胞、好ましくは脾臓またはリンパ節由来の細胞は、対象とする抗原で免疫した動物から得られる。融合細胞(ハイブリドーマ)は選択培養条件を使って単離し、限界希釈法によってクローニングできる。望ましい結合特性をもつ抗体を産生する細胞は適切なアッセイ(例えばELISA)によって選択し得る。

【0025】

CCR4に結合する抗体(ヒト抗体または人工的な抗体を含む)を産生または単離する他の適切な方法が使用され得る。これは、例えば組換え抗体(例えば、単鎖FvまたはFab)をライブラリーから選択する方法や、ヒト抗体または人工的な抗体のレパトリーを産生できるトランスジェニック動物(例えばマウス)の免疫化による方法などを含む(例えば、Jakobovitsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-2555 (1993); Jakobovitsら, Nature, 362:255-258 (1993); Lonbergら, 米国特許第5, 545, 806号; Suraniら, 米国特許第5, 545, 807号などを参照されたい)。

【0026】

単鎖抗体およびキメラ抗体、ヒト化抗体または霊長類化(primatized)(CDR移植)抗体ならびに異なる種に由来する部分を含むキメラ抗体またはCDR移植単鎖抗体なども、本発明および「抗体」という用語に包含される。

これらの抗体の種々の部分は従来の技術によって化学的に互いに連結されたり、遺伝子操作技術を使って連続するタンパク質として製造される。例えば、キメラ鎖またはヒト化鎖をコードする核酸は、連続したタンパク質を産生するように発現され得る。例えば、Cabillyら、米国特許第4,816,567号、Cabillyら、欧州特許第0,125,023 B1号;Bossら、米国特許第4,816,397号;Bossら、欧州特許第0,120,694 B1号;Neuberger, M. S. ら、国際公開第86/01533号;Neuberger, M. S. ら、欧州特許第0,194,276 B1号;Winter, 米国特許第5,225,539号;Winter, 欧州特許第0,239,400 B1号;Queenら、米国特許第5,585,089号、第5,698,761号および第5,698,762号などを参照されたい。また、霊長類化抗体についてはNewman, R. ら、BioTechnology, 10:1455-1460 (1992)、単鎖抗体についてはLadnerら、米国特許第4,946,778号およびBird, R. E. ら、Science, 242:423-426 (1988))も参照されたい。

【0027】

さらに、抗体の機能的断片(キメラ抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体または単鎖抗体の断片を含む)も産生され得る。上述した抗体の機能的断片は、それらの元となる完全長抗体の少なくとも1つの結合機能および/または調節機能を保持している。好ましい機能的断片は対応する完全長抗体の抗原結合機能を保持している(例えば哺乳動物のCCR4を結合する能力を保持している)。特に好ましい機能的断片は、哺乳動物のCCR4に特有な1つ以上の機能(例えば結合活性、シグナル伝達活性および/または細胞性の応答の刺激など)を阻害する能力を保持している。例えば、一実施態様において、機能的断片はCCR4と1つ以上のリガンド(例えばTARC、MDC、MCP-1、MIP-1αおよび/またはRANTES)との相互作用を阻害しおよび/または1つ以上のレセプターが媒介する機能(例えば白血球の輸送、細胞へのHIVの侵入、T細胞の活性化、炎症メディエーターの放出および/または白血球の脱顆粒)を阻害することができる。

【0028】

例えば、哺乳動物のCCR4レセプターまたはその一部に結合できる抗体断片（Fv、Fab、Fab' およびF(ab')₂）を含むが、これらに限定されない）は本発明に包含される。このような断片は、例えば酵素的切断や組換え技術によって産生し得る。例えばババインまたはペプシンによる切断によってそれぞれFab断片またはF(ab')₂断片を生成することができる。抗体は、1つ以上の停止コドンが天然の停止部位の上流に導入されている抗体遺伝子を使って種々の切断された形態で産生することもできる。例えばF(ab')₂重鎖部分をコードするキメラ遺伝子は重鎖のCH₁ドメインとヒンジ領域とをコードするDNA配列を含むように設計することができる。

【0029】

本明細書で使用される「ヒト化免疫グロブリン」という用語は、異なる起源を持つ免疫グロブリンの部分を含む免疫グロブリンであって少なくとも1つの部分がヒト起源のものをいう。したがって本発明は、哺乳動物のCCR4（例えば、ヒトのCCR4、ネズミのCCR4、モルモットのCCR4）に結合するヒト化免疫グロブリンであって、ヒト以外の起源（例えばげっ歯類）の抗原結合領域と、ヒト起源の免疫グロブリン（例えば、ヒトのフレームワーク領域、ヒトの定常領域またはその一部）の少なくとも一部とを含む免疫グロブリンに関する。例えば、ヒト化抗体は、互いに従来の技術（例えば合成）によって化学的に連結されたまたは遺伝子操作技術を使って連結したポリペプチドとして置製された（例えば、キメラ抗体のタンパク質部分をコードするDNAを発現させて連結したポリペプチド鎖を製造することができる）必要な特異性を持つヒト以外の起源（例えばマウス）の免疫グロブリンに由来する部分と、ヒト起源の免疫グロブリン配列に由来する部分（例えば、キメラ免疫グロブリン）を含み得る。本発明のヒト化免疫グロブリンの別の例は、ヒト以外の起源のCDR（例えばヒト以外の起源の抗体に由来する1種以上のCDR）とヒト起源の軽鎖および／または重鎖由来のフレームワーク領域とを含有する1つ以上の免疫グロブリン鎖を含有する免疫グロブリン（例えばフレームワーク変異を持つまたは持たないCDR移植抗体）である。一実施態様において、ヒト化免疫グロブリンは、ヒトのCCR4に対する

結合に関してネズミの1G1、2B10または10E4モノクローナル抗体と競合し得る。好ましい実施態様では、ヒト化免疫グロブリン(a)の抗原結合領域が(例えば1G1、2B10または10E4軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3と、1G1、2B10または10E4重鎖のCDR1、CDR2およびCDR3とからなるヒト化免疫グロブリンの場合のように)1G1、2B10または10E4モノクローナル抗体に由来する。キメラまたはCDR移植単鎖抗体もヒト化免疫グロブリンという用語に包含される。

【0030】

このようなヒト化免疫グロブリンは、所望のヒト化鎖をコードする遺伝子(例えばcDNA)を作製するために合成および/または組換え核酸を使って產生され得る。例えば、ヒト化可変領域をコードする核酸(例えば、DNA)配列は、ヒトまたはヒト化鎖をコードするDNA配列(例えば、予めヒト化された可変領域から得られるDNA鋳型)を改変するためにPCR突然変異導入法を用いて構築できる(例えばKammann, M. ら, *Nucl. Acids. Res.*, 17:5404 (1989); Sato, K. ら, *Cancer Research*, 53:851-856 (1993); Daugherty, B. L. ら, *Nucleic Acids Res.*, 19(9):2471-2476 (1991); Lewis, A. P. および J. S. Crowe, *Gene*, 101:297-302 (1991)などを参照されたい)。バリエーションはこれらの方法または他の適切な方法を使って容易に產生され得る。一実施態様において、クローン化された可変領域は、突然変異され得、所望の特異性を持つバリエーションをコードする配列が選択され得る(例えばファージライブラリーから、例えばKreberら、米国特許第5,514,548号;1993年4月1日に公開されたHoogenboomら、国際公開第93/06213号;1997年3月6日に公開されたKnappikら、国際公開第97/08320号などを参照されたい)。

【0031】

抗イディオタイプ抗体も提供される。抗イディオタイプ抗体は別の抗体の抗原結合部位に関わる抗原決定基を認識する。抗イディオタイプ抗体は、二次抗体を

產生するのに使用される動物と同じ種の、好ましくは同じ系統の動物を免疫化することによって、二次抗体に対して產生させることができる。例えば米国特許第4, 699, 880号を参照されたい。

【0032】

また本発明は、ATCC登録番号HB-12624、HB-12625および
の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株ならびにATCC登録
番号HB-12624、HB-12625および
の下で寄託され
たハイブリドーマ細胞株によって產生されるモノクローナル抗体に関する。本
発明の細胞株はモノクローナル抗体の產生の他にも用途を有する。例えば、本発
明の細胞株をさらなるハイブリドーマを作製するために、他の細胞（適当な薬剤
標識された（drug-marked）ヒトの骨髄腫、マウスの骨髄腫、ヒト
マウスヘテロ骨髄腫またはヒトのリンパ芽球細胞など）と融合させて、モノク
ローナル抗体をコードする遺伝子の伝達を提供することができる。またこれらの細
胞株は抗-CCR4免疫グロブリン鎖をコードする核酸の供給源として使用する
こともできる。これは、単離し、発現させることができる（例えば任意の適切な
技術を使って他の細胞に移入したとき、例えばCabillyら、米国特許第4
, 816, 567号；Winter、米国特許第5, 225, 539号を参照されたい）。例えば、再配列された抗-CCR4軽鎖または重鎖を含むクローンは
（例えばPCRによって）単離され得るか、またはこれらの細胞株から単離され
るmRNAからcDNAライブラリーを作成して抗-CCR4免疫グロブリン鎖
をコードするcDNAクローンを単離され得る。したがって、特異的な免疫グロ
ブリン、免疫グロブリン鎖またはそのバリエーション（例えばヒト化免疫グロブリン
）を様々な宿主細胞中またはインビトロ翻訳系中で產生するために、抗体または
その一部の重鎖および／または軽鎖をコードする核酸を組換えDNA技術に従っ
て取得し使用することができる。例えば、核酸（cDNA、またはヒト化免疫グ
ロブリンもしくは免疫グロブリン鎖などのバリエーションをコードするその誘導体
を含む）は、適切な原核生物または真核生物ベクター（例えば発現ベクター）中に
配置され得る。これを適切な宿主細胞中に適当な方法（例えば形質転換、トラン
スフェクション、エレクトロポレーション、感染など）によって導入することが

できる。その結果、核酸が（例えばベクター中または宿主細胞のゲノム中に組み込まれた）1つ以上の発現制御因子に作動可能な形で連結される。産生のためには、宿主細胞を発現に適した条件下に（例えば誘導物質、適当な塩類が補足された適切な培地、成長因子、抗生物質、栄養補充剤の存在下に）維持することができ、それによりコードされたポリペプチドが産生される。所望であれば、コードされたタンパク質を（例えば、宿主細胞、培地、乳から）回収および/または単離し得る。この産生方法にトランスジェニック動物の宿主細胞中での発現が含まれることは理解されるだろう（例えば、1992年3月19日に公開された国際公開第92/03918号、GenPharm Internationalを参照されたい）。

【0033】

本明細書で記載されているように、本発明の抗体とその機能的断片はCCR4に対するリガンドの結合をブロック（阻害）および/またはCCR4に対するそのリガンドの結合に関連する機能を阻害することができる。以下に述べるように、CCR4に対するリガンドの結合の阻害、および/またはレセプターに対するリガンドの結合に関連する機能を評価するためには、様々な方法を使用することができる。

【0034】

結合アッセイ

本明細書で用いられる「哺乳動物CCR4」とは、天然に生じる(naturally occurring)もしくは内因性の哺乳動物CCR4タンパク質、および天然に生じるもしくは内因性哺乳動物CCR4タンパク質のものと同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質（例えば、組換えタンパク質）をいう。従って、本明細書において規定されるように、前記用語は、成熟受容体タンパク質、多型または対立遺伝子バリエーション、および（例えば、オルタナティブスプライシングまたは他の細胞プロセスによって産生された）哺乳動物CCR4のイソ型、および前記のものの修飾型または未修飾型（例えば、グリコシル化、非グリコシル化）を含む。哺乳動物CCR4タンパク質は単離および/または組換えタンパク質（合成により生産されたタンパク質など）でありうる。天然に生じるまたは内因性の哺乳動物C

CCR4 タンパク質としては、成熟CCR4などの野生型タンパク質、多型または対立遺伝子バリエーションおよび哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類）において、天然に生じる他のイソ型が挙げられる。かかるタンパク質は、例えば、天然に哺乳動物CCR4を生じる供給源から回収または単離される。これらのタンパク質および天然に生じるまたは内因性の対応する哺乳動物CCR4と同一のアミノ酸配列を有する哺乳動物CCR4タンパク質を、対応する哺乳動物の名称によって呼称する。例えば、対応する哺乳動物が、ヒトである場合、タンパク質は、ヒトCCR4タンパク質（例えば、適切な宿主細胞で産生された組換えヒトCCR4タンパク質）として表示される。

【0035】

哺乳動物CCR4タンパク質の「機能的バリエーション」としては、機能的断片、機能的変異タンパク質、および／または機能的融合タンパク質（例えば、変異誘発および／または組換え技術を介して産生されたもの）が挙げられる。一般に、哺乳動物CCR4タンパク質の断片または一部としては、（N-末端、C-末端または内部欠失などの）成熟哺乳動物CCR4タンパク質に関してアミノ酸（すなわち、1以上のアミノ酸）の欠失（すなわち、1以上の欠失）を有するものが挙げられる。成熟哺乳動物CCR4タンパク質に関して連続した（contiguous）アミノ酸のみが欠失された断片もしくはタンパク質、または非連続アミノ酸が欠失された断片もしくはタンパク質も考えられる。

【0036】

一般に、哺乳動物CCR4タンパク質のバリエーションとしては、1以上の連続または非連続アミノ酸残基の付加、欠失および／または置換だけ異なる哺乳動物CCR4タンパク質の天然または人工バリエーション（例えば、受容体キメラ）を含む。かかる変異は、例えば、（他のCXC（ α ）および／またはCC（ β ）ケモカイン受容体と比較して）保存領域または非保存領域、細胞外領域、細胞質領域、または膜貫通領域であり得る。

【0037】

一般に、融合タンパク質は、ペプチド結合を介して、天然に見出される哺乳動物CCR4には存在しない第2の部分（moiety）に連結した、哺乳動物CCR4（

例えば、ヒトCCR4)またはそのバリエーションを第1の部分として含有したポリペプチドを包含する。したがって、第2の部分は、アミノ酸、オリゴペプチドまたはポリペプチドであり得る。第1の部分は、融合タンパク質に対してN-末端位置、C-末端位置または内部であり得る。1つの態様において、融合タンパク質は、緩和解リガンド(例えば、酵素、抗原、エピトープタグ)を第1の部位とし、リンカー配列とヒトCCR4またはその一部とを含有した第2の部位とを含有する。

【0038】

哺乳動物CCR4タンパク質の「機能的断片または一部(portion)」、「機能的バリエーション」およびまたは「機能的融合タンパク質」とは、結合活性、シグナル伝達活性およびまたは細胞応答を刺激する能力などの、本明細書に記載された哺乳動物CCR4タンパク質の少なくとも1つの機能的特徴を有する単離されたおよびまたは組換えタンパク質またはポリペプチドをいう。好ましい機能的バリエーションは、リガンド(すなわち、TARC、MDC、MCP-1、MIP-1αおよびまたはRANTESなどの1以上のリガンド)に結合することができ、本明細書において、「リガンド結合バリエーション」と称される。

【0039】

1つの態様において、哺乳動物CCR4の機能的バリエーションは、該哺乳動物CCR4と少なくとも約85%の配列同一性、好ましくは、該哺乳動物CCR4と少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも約95%の配列同一性を有する。他の態様において、機能的融合タンパク質は、哺乳動物CCR4と少なくとも約85%、好ましくは、少なくとも約90%配列同一性、より好ましくは、哺乳動物CCR4と少なくとも約95%配列同一性を有する第1の部分を含む。配列同一性は、Blastxプログラム(バージョン1.4)などの適切なプログラムを用い、デフォルトパラメーターなどの適切なパラメーターを用いて決定することができる。1つの態様において、Blastxサーチについてのパラメーターは、スコアリングマトリックスBLOSUM62、W=3である。他の態様において、機能的バリエーションは、天然に生じる核酸分子と異なるが、遺伝子コードの縮重により、哺乳動物CCR4またはその一部をコードす

る核酸配列を含有する。

【0040】

単離されたおよび／または組換え哺乳動物CCR4またはその機能的バリエーションを含有した組成物(composition)を、結合に適した条件下に維持することができる。哺乳動物CCR4またはバリエーションと、試験対象抗体または断片とを接触させ、結合を直接的または間接的に検出または測定する。1つの態様において、天然にCCR4を発現する細胞または哺乳動物CCR4またはそのバリエーションをコードする組換え核酸配列を含有した細胞が使用される。前記細胞を、受容体の発現に適した条件下に維持する。前記細胞を、結合に適した条件下で(例えば、適切な結合緩衝液中で)、抗体または断片と接触させ、標準的な技術によって、結合を検出する。結合を測定するには、結合の程度を適切な対照について測定することができる(例えば、抗体の非存在下で測定されたバックグラウンドと比較し、第2の抗体(例えば、標準)の結合と比較し、抗体の非トランスフェクト細胞への結合と比較する)。受容体を含有した膜画分または受容体を含有したリボソームを含有した膜画分などの細胞画分を全細胞の代わりに使用することができる。

【0041】

1つの態様において、抗体を適切な標識(例えば、蛍光標識、同位体標識、抗原またはエпитープ標識、酵素標識)で標識し、標識の検出により、結合を測定する。他の態様において、結合した抗体を、標識された第2の抗体によって検出することができる。結合の特異性は、例えば、非標識抗体またはコンペティターとしての非標識抗体またはリガンドを用い、競合または置換によって評価することができる。

【0042】

また、結合阻害アッセイを用いて、CCR4に結合し、かつリガンド(例えば、TARC、MDC、MCP-1、MIP-1 α および／またはRANTES)などの他の化合物のCCR4または機能的バリエーションへの結合を阻害する抗体またはその断片を同定することができる。例えば、抗体の非存在下におけるリガンドの結合と比較して、(抗体の存在下での)CCR4のリガンドの結合の減少を

検出または測定する結合アッセイを行なうことができる。単離されたおよび／または組換え哺乳動物CCR4もしくはその機能的バリエーションを含有した組成物を、リガンドおよび抗体と同時、または他方の後に一方を、いずれかの順序で接触させる。抗体の非存在下におけるリガンドの結合の程度の低下は、抗体による結合の阻害の指標である。例えば、リガンドの結合は減少または破壊する(abolish)ことができる。

【0043】

1つの態様において、リガンド(例えば、TARCまたはMDCなどのケモカイン)の哺乳動物CCR4またはそのバリエーションの結合の、抗体または断片による直接的阻害をモニターする。例えば、¹²⁵I-標識TARC、¹²⁵I-標識MDC、¹²⁵I-標識MCP-1、¹²⁵I-標識MIP-1 α または¹²⁵I-標識RANTESの哺乳動物CCR4への結合を阻害する抗体の能力をモニターすることができる。そのようなアッセイは、例えば、単離された血液細胞(例えば、T細胞など)または天然にCCR4を発現する適切な細胞株、または哺乳動物CCR4をコードする核酸を含有する細胞株、または該細胞からの膜画分などの、CCR4を生じる適切な細胞株またはその機能的バリエーションを用いて行なうことができる。

【0044】

他の適切な結合アッセイ、またはシグナル伝達機能および／または細胞応答の刺激(例えば、白血球の輸送)を含む、受容体結合により引き起こされる事象をモニターする方法などの、CCR4に結合する抗体の存在を同定する方法が利用できる。

【0045】

本発明の抗体の阻害効果は、結合阻害アッセイで評価されることが理解される。受容体結合のための抗体の間の競合を、該方法で評価することもできる。このようにして同定された抗体をさらに評価して、結合に続いて、それらがCCR4の他の機能を阻害するように、および／またはそれらの治療利用性を評価するように作用するか否かを判断することができる。

【0046】

シグナル伝達アッセイ

アゴニストなどのリガンドまたは促進物質のCCR4への結合は、このGタンパク質-共役型受容体によるシグナル伝達をもたらされ得、Gタンパク質ならびに他の細胞内シグナル伝達分子の活性が刺激される。化合物（例えば、抗体またはその断片）によるシグナル伝達機能の誘導は、いかなる適切な方法を用いてもモニターすることができる。そのようなアッセイを用いて、CCR4の抗体アゴニストを同定することができる。抗体またはその機能的断片の阻害活性は、アッセイにおいてリガンドまたは促進物質を用い、リガンドまたは促進物質によって誘導された活性を阻害する抗体の能力を評価し、測定することができる。

【0047】

GTPのGDPへの加水分解、または細胞内（細胞質）遊離カルシウム $[Ca^{2+}]_i$ の濃度の迅速かつ一過性の増加の誘導などの、受容体結合により引き起こされる後のシグナル伝達事象のようなGタンパク質活性は、当該分野で公知の方法または他の適切な方法によってアッセイすることができる（例えば、Neote, K. ら, Cell 72:415-425 (1993); Van Riper, J. Exp. Med., 177:851-856 (1993); Dahinden, C. A. ら, J. Exp. Med., 179:751-756 (1994)）。

【0048】

例えば、ハイブリッドGタンパク質結合受容体を用いるSledziewskiらの機能アッセイを用いて、受容体に結合し、かつGタンパク質を活性化するリガンドまたは促進物質の能力をモニターすることができる（Sledziewskiら, 米国特許第5,284,746号明細書、その教示は、参照により本明細書に取り込まれる）。

【0049】

かかるアッセイは、評価対象である抗体またはその断片の存在下で行なうことができ、リガンドまたは促進物質によって誘導された活性を阻害する抗体または断片の能力は、公知の方法および/または本明細書に記載された方法を用いて測定される。

【0050】

化学走性および細胞刺激のアッセイ

また、化学走性アッセイを用いて、リガンドの哺乳動物CCR4またはその機能的バリエーションへの結合をブロックする能力、および/またはリガンドの受容体への結合に関連する機能を阻害する抗体またはその機能的断片の能力を評価することができる。これらのアッセイは、化合物によって誘導されたイン・ビトロまたはイン・ビボでの細胞の機能的移動に基づく。化学走性は、例えば、96ウェル化学走性プレートを用い、または化学走性を評価するための他の当該分野で認識された方法を用いるアッセイにおいて、実施例に記載したように評価しうる。例えば、イン・ビトロ経内皮細胞化学走性アッセイの使用はSpringerらによって記載されている(Springerら, 国際公開第94/20142号パンフレット, 1994年9月15日に発表, その教示は、参照により本明細書に取り込まれる; また, Bermanら, Immunol. Invest., 17:625-677 (1988))。内皮を通過するコラーゲンゲルへの移動もまた記載されている(Kavanaughら, J. Immunol., 146:4149-4156 (1991))。例えば、マウスL1.2ブレイB細胞の、および化学走化しうる適切な宿主細胞の安定なトランスフェクタントを化学走性アッセイで用いることができる。

【0051】

一般に、化学走性アッセイは、バリアー（例えば、内皮、フィルター）の中へのまたはそれを通っての、化合物の増大したレベルに向けての、バリアーの表面から対向する第2の表面に向けての、(リンパ球、好酸球、好塩基球などの)適切な細胞の方向性運動または移動をモニターする。膜またはフィルターは、適切な細胞のフィルターへのまたはそれを通っての、フィルターの第2の表面への、フィルターの第1の表面からフィルターの対向する第2の表面への方向性運動または移動がモニターされるように、便宜なバリアーを提供する。いくつかのアッセイにおいて、膜は、ICAM-1、フィブロネクチンまたはコラーゲンなどの接着を容易にする物質で被覆する。そのようなアッセイは白血球「ホーミング(homing)」のイン・ビトロ近似を提供する。

【0052】

例えば、試験対象の抗体と接触し、膜によって第1のチャンバーから分割される第2のチャンバーへの多孔性膜へのまたはそれを通っての第1のチャンバーからの、（包含手段(a containing means)）適切な容器中の細胞の移動の阻害を検出または測定することができる。例えば、ニトロセルロース、ポリカーボネートを含めた、化合物に反応しての特異的移動をモニターするための適切なポアサイズを有する適切な膜を選択する。例えば、約3-8ミクロン、好ましくは約5-8ミクロンのポアサイズを用いることができる。ポアサイズはフィルター上で均一であるか、または適切なポアサイズの範囲内である。

【0053】

移動および移動の阻害を評価するには、フィルターへの移動の距離、フィルターの第2の表面に接着したままであるフィルターを横切る細胞の数、および/または第2のチャンバーに蓄積する細胞の数を、標準的な技術（例えば、顕微鏡）を用いて検出することができる。1つの態様において、細胞を検出可能な標識（例えば、放射性同位体、蛍光標識、抗原またはエпитープ標識）を用いて測定することができ、移動は、適切な方法を用い、膜に接着したおよび/または第2のチャンバーに存在するまたは標識の存在を測定することによって（例えば、放射活性、蛍光、イムノアッセイによって）、抗体または断片の存在または非存在下で評価することができる。抗体アゴニストによって誘導された移動の程度は、適切な対照に対して測定することができる（例えば、抗体の非存在下で測定したバックグラウンド移動と比較し、第2の化合物（すなわち、標準）によって誘導された移動の程度と比較し、抗体によって誘導された非トランスフェクト細胞の移動と比較する）。

【0054】

1つの態様において、特に、T細胞、単球、または哺乳動物CCR4発現細胞については、経内皮細胞移動をモニターすることができる。この態様において、内皮細胞層を介する移動を評価する。細胞層を調製するには、内皮細胞を、所望により、内皮細胞の付着を容易にするためのコラーゲン、フィブロネクテン、または他の細胞内マトリックスタンパク質などの物質で被覆される多孔性フィルタ

一または膜上で培養することができる。好ましくは、内皮細胞は、コンフルエントな単層が形成されるまで培養する。例えば、ヒト肺静脈内皮細胞 (Clonetics Corp, San Diego, CA) などの、静脈、動脈または微小血管内皮細胞などの種々の哺乳動物内皮細胞が単層形成のために利用できる。特定の哺乳動物受容体に応答しての化学走性を評価するには、同一哺乳動物の内皮細胞が好ましい；しかしながら、異種哺乳動物種または属からの内皮細胞も使用できる。

【0055】

一般に、前記アッセイは、第1の表面に内皮細胞層を含むフィルターの第1の表面からフィルターの対向する第2の表面に向けての、化合物の増大するレベルに向けての方向での、膜またはフィルターへのまたはそれを通っての細胞の方向性の移動を検出することによって行われる。方向性の移動は、第1の表面に隣接する領域から、膜へのまたはそれを通っての、フィルターの対向する側に位置する化合物に向けて起こる。第2の表面に隣接する領域に存在する化合物の濃度が第1の表面に隣接する領域におけるものよりも大きい。

【0056】

抗体阻害物質について試験するのに用いられる1つの態様において、移動でき、かつ哺乳動物CCR4受容体を発現しうる細胞を含有した組成物が、第1のチャンバーに配置されうる。第1のチャンバー中の細胞の化学走性を誘導できる1以上のリガンドまたは促進物質を含有した組成物（化学誘因機能を有する）を第2のチャンバーに入れる。好ましくは、細胞を第1のチャンバーに入れる直前または該細胞と同時に、試験対象の抗体を含有した組成物を、好ましくは、第1のチャンバーに入れる。このアッセイにおいては、受容体に結合し、哺乳動物CCR4発現細胞の化学走性の、リガンドまたは促進物質による誘導を阻害できる抗体またはその機能的断片は、受容体機能の阻害物質（例えば、刺激機能の阻害物質）である。抗体または断片の存在下に、リガンドまたは促進物質によって誘導される移動の程度の低下は、阻害活性の指標である。別の結合試験（前記参照）を行なって、阻害が、抗体または受容体の結合の結果であるか、異なるメカニズムを介して起こるか否かを判断できる。

【0057】

組織における化合物（例えば、ケモカインまたは抗体）の注入に応答した組織の白血球浸潤をモニターするイン・ビボアッセイを後述する（Models of Inflammation参照）。イン・ビボホーミングのこれらのモデルは、炎症の部位への移動および化学走性によるリガンドまたは促進物質に应答する細胞の能力を測定し、およびこの移動をブロックする抗体またはその断片の能力を評価する。

【0058】

記載された方法において、CCR4の刺激機能に対する抗体または断片の効果は、受容体を含む適切な宿主を用い、活性受容体によって誘導された細胞応答をモニターすることにより評価されうる。

【0059】

哺乳動物のCCR4機能のさらなるリガンド、阻害物質、および/または促進物質の同定

本発明の抗体および断片の結合および機能の評価するために用いられる上記アッセイ法を調整し、哺乳動物CCR4、またはその機能的バリエーションに結合する別のリガンドまたはそれ以外の物質、ならびにCCR4機能の阻害物質および/または哺乳動物CCR4機能の促進物質を同定することができる。例えば、本発明の抗体またはその一部を用いた競合アッセイ法によって、本発明の抗体またはその機能的部分の機能と同一ないし類似した結合特異性を有する薬剤を同定することができる。したがって、本発明は、レセプターのリガンド、または哺乳動物CCR4タンパク質に結合する他の物質、および、レセプター機能の阻害物質（例えば、アンタゴニスト）または促進物質（例えば、アゴニスト）の同定法をも包含する。1つの態様において、哺乳動物CCR4タンパク質、またはその機能的バリエーションを産生する細胞（例えば、細胞に導入された核酸によりコードされた哺乳動物CCR4タンパク質または機能的バリエーションを発現するよう改変された白血球、細胞株または適切な宿主細胞）は、リガンドや、レセプター機能の阻害物質または促進物質などの、レセプターに結合する他の物質の効力を同定および判定するアッセイ法に用いられる。かかる細胞は、発現されたレセプタータ

ンパク質またはポリペプチドの機能を評価するのに有用である。

【0060】

本発明によれば、リガンド、およびレセプターに結合する他の物質、すなわちレセプター機能の阻害物質または促進物質を適切なアッセイ法によって同定し、さらに、治療効果を評価することができる。レセプター機能の阻害物質は、レセプター活性を阻害（低下または阻止）するのに用いられ得、リガンドおよび／または促進物質は、示された正常なレセプター機能を誘導（開始または促進）するのに用いられる。したがって、本発明は、レセプター機能の阻害物質を個体（例えば、哺乳動物）に投与することを含む、自己免疫疾患および移植片拒絶などの炎症疾患を治療する方法を提供する。さらに、本発明は、レセプター機能の新規のリガンドまたは促進物質を個体に投与することによって、レセプター機能を刺激する方法を提供し、白血球機能を選択的に刺激するための新規の手がかりを提供するが、これは、例えば、感染症や癌の治療に役立つ。

【0061】

本明細書に用いられるように、哺乳動物CCR4の「リガンド」とは、天然のリガンド、ならびに天然リガンドの合成型および／または組換え型を含む、哺乳動物CCR4タンパク質に結合する物質の特定の分類群を意味する。哺乳動物CCR4陽性細胞に対する親和性を有する感染病原体（例えば、HIVなどのウイルス）も、哺乳動物CCR4タンパク質に結合することができる。選ばれたレセプターの天然のリガンドは、哺乳動物CCR4タンパク質のリガンド（例えば、TARC、MDC、MCP-1、MIP-1αおよび／またはRANTESなどのケモカインなど）と同じ哺乳動物由来である。好ましい態様では、哺乳動物CCR4タンパク質のリガンド結合は、高い親和性で生じる。

【0062】

本明細書に用いられるように、「阻害物質」とは、結合活性（例えば、リガンド結合、促進物質結合、抗体結合）、シグナル伝達活性（例えば、哺乳動物Gタンパク質の活性化、細胞質中の遊離カルシウム $[Ca^{2+}]_i$ の急激かつ一過的な濃度上昇の誘発など）、および／または細胞応答機能（例えば、白血球の定着性、エキソサイトーシス、または炎症メディエーター放出）など、哺乳動物CCR

4タンパク質（例えば、ヒトCCR4）に特徴的な機能の一つ以上を阻害（低下または阻止）する物質である。阻害物質は、HIVが細胞の中に侵入するのを阻害する物質でもある。阻害物質という語は、レセプターに結合するアンタゴニスト（例えば、抗体、天然リガンドのバリエーション、低分子量の有機分子、その他リガンド結合の競合阻害物質）、および、レセプターに結合することなく、レセプター機能を阻害する物質（例えば、抗イディオタイプ抗体）などの物質を意味する。

【0063】

ここで、「促進物質」とは、結合活性（例えば、リガンド結合、促進物質結合、抗体結合）、シグナル伝達活性（例えば、哺乳動物Gタンパク質の活性化、細胞質中の遊離カルシウム $[Ca^{2+}]_i$ の急激かつ一過的な濃度上昇の誘導など）、および/または細胞応答機能（例えば、白血球の走化性、エキソサイトーシス、または炎症メディエーター放出）など、哺乳動物CCR4タンパク質（例えば、ヒトCCR4）に特徴的な機能の一つ以上を促進（誘導、惹起、亢進、または増加させる）物質である。促進物質という語は、レセプターに結合するアゴニスト（例えば、抗体、別種由来の天然リガンドのホモログなど）、および、レセプターに結合することなくレセプター機能を（例えば、会合するタンパク質を活性化することによって）促進させる物質を意味する。好ましい態様においては、アゴニストは、天然のリガンドのホモログ以外のものである。

【0064】

したがって、本発明は、哺乳動物のC-ケモカインレセプター4またはそのリガンド結合バリエーションに結合する、リガンド、阻害物質、促進物質、および哺乳動物CCR4タンパク質またはその機能的バリエーションに結合する他の物質などの薬剤を検出または同定する方法にも関する。本方法によれば、試験対象の薬剤、本発明の抗体または抗原結合断片（例えば、1G1；2B10；10E4；1G1、2B10または10E4のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性を有する抗体、およびこれらの抗原結合断片）、および哺乳動物のC-ケモカインレセプター4またはそのリガンド結合バリエーションを含有した組成物を組み合わせることができる。抗体または抗原結合断片が哺乳動物のC-ケモカ

インレセプター4またはそのリガンド結合バリエーションに結合するのに適した条件下で上記成分を組み合わせ、哺乳動物C C-ケモカインレセプター4またはそのリガンド結合バリエーションへの抗体またはその断片の結合を、本明細書記載の方法または適切な他の方法により、直接または間接的に検出または測定する。適切な対照（例えば、試験対象の薬剤非存在下）に比べて、形成された複合体の量が減少すれば、薬剤が該レセプターまたはそのバリエーションに結合することの指標となる。哺乳動物C C-ケモカインレセプター4またはそのリガンド結合バリエーションを含む組成物は、組換えケモカインレセプター4またはそのリガンド結合バリエーションを産生する細胞の膜画分でもよい。抗体またはその断片は、放射性同位元素、スピン標識、抗原またはエピトープ標識、酵素標識、蛍光基および化学発光基などの標識によって標識することができる。

【0065】

1つの態様において、本発明は、試験対象の薬剤、本発明の抗体または抗原結合断片（例えば、1G1；2B10；10E4；1G1、2B10または10E4のエピトープ特異性と同一または類似のエピトープ特異性をもつ抗体、またはこれらの抗原結合断片）、および哺乳動物のC C-ケモカインレセプター4またはそのリガンド結合バリエーションを産生する細胞を組み合わせることを含む、哺乳動物C C-ケモカインレセプター4またはそのリガンド結合バリエーションに結合する薬剤を検出または同定する方法に関する。上記成分は、抗体または抗原結合断片が哺乳動物のC C-ケモカインレセプター4またはそのリガンド結合バリエーションに結合するのに適した条件下で組み合わせられ、該抗体またはその断片によるC C R 4タンパク質またはそのリガンド結合バリエーションへの結合を、本明細書記載の方法または適切な他の方法により、直接または間接的に検出または測定する。適切な対照と比べて、形成された複合体の量が減少すれば、薬剤が該レセプターまたはそのバリエーションに結合することの指標となる。抗体またはその断片は、放射性同位元素、スピン標識、抗原またはエピトープ標識、酵素標識、蛍光基および化学発光基からなるグループより選択された標識によって標識することができる。これらのアッセイ、および同様のアッセイを用いて、リガンド（例えば、ケモカイン、C C R 4と相互作用するH I V株）または他の物質で、レセプター機能

の阻害物質または促進物質など、CCR4に結合して、レセプター結合について、本明細書記載の抗体と競合する物質などの薬剤を検出することができる。

【0066】

前記アッセイ法は、単独で、もしくはそれぞれを組み合わせて、または、適切な別法と組み合わせて、哺乳動物CCR4タンパク質に結合するリガンドまたは他の物質、および哺乳動物CCR4タンパク質またはそのバリエーションの阻害物質または促進物質を同定するために用いることができる。本発明のインビトロ法は、多数の試料を処理するハイスループットスクリーニング（例えば、96穴方式）を行うために調整することができる。ハイスループットスクリーニングを行なうのに適した量の哺乳動物CCR4（例えば、ヒトCCR4）を発現する細胞を用いることができるため、このような細胞は、レセプターに結合するリガンドまたは他の物質、および哺乳動物CCR4タンパク質の阻害物質または促進物質を同定および/または単離するのに有用である。レセプターの発現は、さまざまな方法でモニターすることができる。例えば、レセプターまたはその一部に結合する、本発明の抗体を用いて、発現を観察することができる。また、市販の抗体を用いて、レセプタータンパク質またはポリペプチド（例えば、FLAGでタグしたレセプター）を含み、抗原またはエピトープでタグングした融合タンパク質の発現を検出ことができ、所望の量が発現する細胞を選択することができる。

【0067】

哺乳動物CCR4タンパク質またはその機能的バリエーションをコードする核酸を発現系に組み込んで、レセプタータンパク質またはポリペプチドを産生しうる。哺乳動物CCR4タンパク質またはそのバリエーションをコードする組換え核酸を含む有した構築物により、安定にまたは一過的にトランスフェクトされた細胞内、またはレセプターを含む細胞画分（例えば、トランスフェクト細胞、レセプターを組み込んだリボソーム）の中で発現するレセプターなど、単離および/または組換え哺乳動物CCR4タンパク質またはバリエーションを、レセプター機能を調べるために用いることができる。所望であれば、前記レセプターをさらに精製することができる。レセプター機能の試験は、インビトロまたはインビボで行なわれる。

【0068】

ヒトCCR4などの、単離されたおよび/または組換え哺乳動物CCR4タンパク質またはその機能的バリエーションを、本明細書に記載したように、レセプター機能をモニターすることまたは他の適切な技術を用いることにより、化合物の効果を判定する本方法で用いることができる。例えば、安定または一過的なトランスフェクタント（例えば、バキュロウイルス感染SF9細胞、マウスL1.2プレB細胞など）を、結合アッセイ法において用いることができる。例えば、ジャーカット細胞、または化学走性しうる他の適切な細胞（例えば、マウスL1.2プレB細胞）の安定なトランスフェクタントを走化性アッセイに用いる。

【0069】

本発明の方法によれば、化合物を個別にスクリーニングしたり、本明細書記載の方法によって1種以上の化合物を同時に調べることもできる。化合物の混合物を試験する場合、記載されたプロセスにより選択された化合物を適切な方法（例えば、PCR、シークエンシング、クロマトグラフィー、質量分析法）によって、（適切に）分離し、同定することができる。試験対象の試料における1種以上の化合物（例えば、リガンド、阻害物質、促進物質など）の存在も、これらの方法によって決定することができる。

【0070】

コンビナトリアル化学合成法または別法によって作出された化合物（例えば、有機化合物、組換えまたは合成したペプチド、“ペプチド”、核酸など）のラージコンビナトリアルライブラリーを調べることができる（例えば、Zuckerman, R. N. 氏ら、J. Med. Chem., 37:2678-2685 (1994) およびそこで引用されている文献を参照のこと；また、Ohlmyer, M. H. J. 氏ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10922-10926 (1993)、ならびに、タグされた化合物については、DeWitt, S. H. 氏ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909-6913 (1993)；Rutten, W. J. 氏ら、米国特許第5,010,175号明細書；Huebner, V. D. 氏ら、米国特許第5,182,366号明細書；およびGeysen, H. M. 米国特許第4,8

33, 092号明細書参照)。本方法によりコンビナトリアルライブラリーから選抜された化合物がユニークなタグを持っていれば、クロマトグラフィー法による各化合物の同定が可能になる。

【0071】

1つの態様において、ファージディスプレイ法を用いる。例えば、哺乳動物CCR4タンパク質またはその機能的バリエーション、本発明の抗体またはその機能的部位、およびポリペプチドを提示するファージ（例えば、ファージ、またはライブラリーなどのファージのコレクション）を、抗体またはその一部が哺乳動物CCR4タンパク質またはバリエーションに結合するのに適した条件下（例えば、適切な結合バッファー中）で組み合わせることができる。抗体またはその一部と競合して、哺乳動物CCR4タンパク質またはその機能的バリエーションに結合するファージは、標準的な技術または他の適切な方法を用いて検出または選抜することができる。結合したファージは、適切な溶出用バッファーを用いて、レセプターから分離することができる。例えば、イオン強度またはpHを変えてファージの遊離をもたらすことができる。または、溶出用バッファーは、遊離成分、または、化合物の結合を破壊するように設計された成分（例えば、結合を競合阻害するリガンド、阻害物質、および/または促進物質など、提示されたペプチドがレセプターに結合するのを破壊できる1種以上の化合物）を含有する。任意に、選抜プロセスを繰り返したり、別の選抜ステップを用いて、レセプターに結合するファージをさらに富化することができる。提示されたポリペプチドの特徴を（例えば、ファージDNAの配列を決定して）調べることができる。同定されたポリペプチドを産生させて、さらに結合について、および阻害物質または促進物質の機能について調べることができる。かかるペプチドのアナログで、安定性が増加したか、他の所望の性質を有するペプチドアナログを製造することができる。

【0072】

1つの態様において、任意の配列の核酸によってコードされたN末端ペプチドを有するコートタンパク質を含有し、融合タンパク質を発現し提示するファージを作出することができる。哺乳動物CCR4タンパク質またはバリエーション、および抗CCR4抗体またはその機能的部位を発現する適切な宿主細胞をファージ

と一緒に、結合してファージを選抜し、回収して特徴を調べる。(例えば、DoorbarおよびWinter, J. Mol. Biol. 244:361 (1994) (Gタンパク質共役型レセプターとともに用いられるファージディスプレイ法を検討している)、および1997年3月6日に公開された国際公開第97/08320号パンフレット(Morphosys)を参照のこと)。

【0073】

哺乳動物CCR4タンパク質のリガンド、それに結合する他の物質、またはその阻害物質および/または促進物質の可能性のあるものが得られる他のソースとしては、限定されないが、TARC、MDC、MCP-1、MIP-1 α および/またはRANTESの天然、合成、または組換えバリエーションなどのCCR4リガンドのバリエーション、他の化学誘引物質またはケモカインなどの物質、それらのバリエーション、低分子量有機分子、他の阻害物質および/または促進物質(例えば、抗-CCR4抗体、アンタゴニスト、アゴニストなど)、他のGタンパク質共役型レセプターリガンド、阻害物質および/または促進物質(例えば、アンタゴニスト、アゴニストなど)、および、適切なレセプターペプチド、またはレセプター機能を阻害することのできる適切なレセプターペプチドまたはアナログなど、哺乳動物CCR4レセプターの可溶性部分(例えば、Murphy, R. B., 国際公開第94/05695号パンフレットを参照)などが挙げられる。

【0074】

炎症のモデル

本発明の抗体および断片のインビボでの治療薬としての効果を判定するために用いることのできるインビボの炎症モデルを利用することができる。例えば、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、またはアカゲザルなど、適当な動物にケモカインと、哺乳動物CCR4に反応する抗体またはその断片を皮内注射したときの白血球の浸潤をモニターすることができる(例えば、Van Damme, J. ら, J. Exp. Med., 176:59-65 (1992); Zachariae, C. O. C. ら, J. Exp. Med., 171:2177-2182 (1990); Jose, P. J. ら, J. Exp. Med., 179:881-887 (1994) 参照)。一つの実施態様において、皮膚の生検を、白血

球（例えば、好酸球、顆粒球など）の浸潤について組織学的に判定する。別の実施態様において、化学走性および血管外遊出能力をもつ標識された細胞（例えば、哺乳動物CCR4を発現する安定にトランスフェクトされた細胞で、¹¹¹ Inで標識されたもの）を動物に投与する。例えば、判定対象の抗体または断片は、リガンドまたはアゴニストを試験動物に投与する前か後、またはこれと同時に投与することができる。阻害物質不在下での浸潤の程度と較べた場合の、抗体存在下での浸潤の程度の減少が阻害の指標となる。

【0075】

診断および治療への適用

本発明の抗体および断片は、研究、診断、および治療への適用など、さまざまな適用場面に役立つ。一つの実施態様において、適当な標識（例えば、蛍光標識、化学発光標識、アイソトープ標識、抗原またはエピトープ標識、または酵素標識）によって抗体を標識する。例えば、それらを用いて、レセプターまたはその一部を単離および／または精製したり、レセプター構造（例えば、立体構造）および機能を研究することができる。

【0076】

さらに、本発明のさまざまな抗体を用いて、CCR4を検出したり、例えば、T細胞（例えば、CD8⁺細胞、CD45RO⁺細胞）、単球、および／またはレセプター遺伝子でトランスフェクトされた細胞などの上でのレセプター発現を測定することができる。したがって、診断や研究目的で、細胞選別（例えば、フローサイトメトリー、蛍光標示式細胞分取）などに適用することもできる。

【0077】

本発明の抗-CCR4抗体は、診断に適用する上で価値がある。抗-CCR4抗体またはその断片は、抗-CD4をHIVの段階の診断指標として用いたときと同様の方法で、各個体におけるこのレセプターの発現をモニターすることができる。

【0078】

一般的に、診断アッセイでは、抗体またはその断片がCCR4に結合してできる複合体の形成を検出する必要がある。診断目的で、抗体または抗原結合断片を

標識したり、非標識化することができる。抗体または断片を直接標識することができる。放射性核種、蛍光剤、酵素、酵素基質、酵素補助因子、酵素阻害物質およびリガンド（例えば、ビオチン、ハプテンなど）などがあるが、これらに限定されない、さまざまな標識を用いることができる。数多くの適切な免疫アッセイ法が当業者に知られている（例えば、米国特許第3,817,827号；第3,850,752号；第3,901,654号および第4,098,876号を参照）。標識されていないときには、例えば、凝集アッセイ法など、適当な手段を用いて、抗体または断片を検出することができる。非標識抗体または断片は、最初の抗体と反応する標識抗体（例えば、二次抗体）など、抗体を検出するために使用できる別の（すなわち、一つ以上の）適当な試薬（例えば、抗イディオタイプ抗体、または、非標識免疫グロブリンに特異的な別の抗体）、または他の適当な試薬（例えば、標識されたプロテインA）と組み合わせて用いることもできる。

【0079】

一つの実施態様において、本発明の抗体または断片は、酵素免疫測定法に利用することができるが、その場合、本発明の抗体または断片、もしくは二次抗体が酵素に結合している。哺乳動物CCR4タンパク質を含む生物学的試料を該抗体と合わせると、抗体とCCR4タンパク質の間で結合が生じる。一つの実施態様において、ヒト血液のように、哺乳動物CCR4タンパク質を発現する細胞を含む試料を該抗体と合わせると、抗体と、該抗体によって認識されるエピトープを含むヒトCCR4タンパク質を有する細胞との間で結合が生じる。これらの結合細胞を非結合の試薬から分離し、例えば、試料を、酵素作用を受けると発色やその他検出可能な変化を生じる酵素基質に接触させて、細胞に特異的に結合している抗体-酵素結合物の存在を測定することができる。別の実施態様において、本発明の抗体を標識せずに、該抗体を認識する標識二次抗体を加えることができる。

【0080】

生物学的試料中に哺乳動物CCR4タンパク質が存在することを検出するとき、に使用するキットを調製することもできる。このようなキットには、哺乳動物C

C-ケモカインレセプター4または該レセプターの一部に結合する抗体またはその機能的断片、および、抗体または断片とCCR4またはその一部との間の複合体の存在を検出するのに適した一種類以上の補助試薬が含まれている。本発明の抗体組成物は、単独、または、別のエピトープに特異的な別の抗体と組み合わせ、凍結乾燥した形で提供することができる。抗体は、標識されていなくても、添加成分（例えば、トリス、リン酸および炭酸などの緩衝液、安定化剤、賦形剤、殺生物剤、および/または、例えば、ウシ血清アルブミンなどの不活性タンパク質）とともにキットに含まれる。例えば、抗体は、添加成分との凍結乾燥混合物として提供することができるが、もしくは使用者が組み合わせられるように添加成分を別に提供することもできる。一般的に、これらの添加物質は、活性抗体量に基づいて約5重量%よりも少なく、通常は、全量で、抗体濃度の約0.001重量%以上存在する。モノクローナル抗体に結合できる二次抗体を利用するとき、この抗体は、例えば、別のバイアル瓶または容器に入れて、キットの中で提供することができる。二次抗体が存在するときには、この二次抗体は、一般的には標識されており、上記の抗体処方物と同様の方法で処方することができる。

【0081】

同様に、本発明は、哺乳動物CCR4またはこのレセプターの一部の細胞による発現を検出および/または定量する方法で、抗体またはその断片が結合するのに適した条件下で、細胞またはその画分（例えば、膜画分）を含む組成物を、哺乳動物CCR4またはこのレセプターの一部に結合する抗体またはその機能的断片（例えば、1G1および/または2B10および/または10E4）に接触させ、結合をモニターする方法にも関する。抗体と、CCR4またはその一部との間で複合体を形成したことを示す、抗体の検出は、該レセプターの存在を示している。抗体の細胞への結合は、例えば、「結合アッセイ」という見出しの下で上記したようにして測定することができる。この方法を用いて、（例えば、血液、唾液などの体液などの試料、またはその他適当な試料中の）個体由来の細胞上でのCCR4発現を検出することができる。また、T細胞または単球の表面におけるCCR4発現量を、例えば、フローサイトメトリーによって測定することができる。

き、発現量（例えば、染色強度）が、病気感受性、病気の進行またはリスクと関連していることがある。

【0082】

ケモカインレセプターは、身体全体、特に、炎症部位に白血球が移動するときに機能する。尿管からの炎症細胞の遊出は、白血球および内皮細胞接着タンパク質および細胞特異的の化学誘引物質および活性化因子との相互作用を含む3段階のプロセスによって制御されている（Springer, T. A., Cell, 76:301-314 (1994); Butcher, E. C., Cell, 67:1033-1036 (1991); Butcher, E. C. と Picker, L. J., Science (Wash. DC), 272:60-66 (1996)）。これらは：(a) 白血球のセレクトインと内皮細胞の炭水化物との間の低親和性相互作用；(b) 白血球の化学誘引物質レセプターと化学誘引物質／活性化因子との間の高親和性相互作用；ならびに (c) 白血球のインテグリンと、免疫グロブリンスーパーファミリーの内皮細胞接着タンパク質との間の緊密な結合である。白血球のサブセットが異なると、セレクトイン、化学誘引物質レセプター、およびインテグリンの異なったレパートリーを発現する。さらに、炎症が起きると、内皮接着タンパク質の発現、および化学誘引物質および白血球活性化因子の発現が変わる。その結果、血管外部位に白血球を補充するときの選択性の制御が非常に多様になる。第二の工程は、白血球化学誘引物質レセプターの活性化が、セレクトイン媒介性のセルローリング (cell rolling) からインテグリン媒介性の緊密な結合への変化を引き起こすと考えられている点で重要である。この結果、白血球が血管周囲部位に遊出する準備ができる。化学誘引物質／化学誘引物質レセプター相互作用も、経内皮遊走、および組織内への局在化にとって重要である（Campbell, J. J. ら, J. Cell Biol., 134:255-266 (1996); Carr, M. W. ら, Immunity, 4:179-187 (1996)）。この遊走は、炎症の中心に導く化学誘引物質の濃度勾配によって誘発される。

【0083】

CCR4は、白血球輸送に重要な役割を果たしている。CCR4は、一定の炎

症部位へのT細胞、T細胞サブセット、または単球の遊走に関する重要なケモカインレセプターである可能性が高いため、抗-CCR4mAbを用いて、T細胞または単球の遊走、特に、自己免疫疾患またはアレルギー反応などのT細胞機能異常、または、アテローム性動脈硬化症など、単球媒介性障害に関連する遊走を阻害（減少または阻止）することができる。したがって、本発明の抗体およびその断片を用いて、研究や治療への適用場面で、レセプター機能を調節することもできる。例えば、本明細書記載の抗体および機能的断片は、（a）（例えば、リガンド、阻害物質、またはプロモーター（promoter）の）レセプターへの結合、（b）レセプターのシグナル伝達機能、および/または（c）刺激機能を阻害（低下または阻止）するための阻害物質として作用することができる。レセプター機能の阻害物質として作用する抗体は、（例えば、立体構造の変化を生じさせることによって）直接または間接的に、リガンドまたはプロモーターの結合をブロックすることができる。例えば、抗体は、リガンドの結合を阻害することによって、または、（リガンドの結合を阻害したり、阻害することなしに）脱感作することによってレセプター機能を阻害することができる。レセプターに結合する抗体は、レセプター機能のアゴニストとしても作用することができ、レセプターに結合して、レセプターのシグナル伝達機能および/または刺激機能（例えば、白血球の輸送）などのレセプター機能を開始または刺激する。

【0084】

このように、本発明は、哺乳動物（例えば、ヒトの患者）における白血球の輸送を阻害する方法で、哺乳動物に本発明の抗体またはその機能的断片を有効量投与することを含む方法を提供する。本発明の抗体または断片を投与すると、疾病状態の改善または解消をもたらすことができる。

【0085】

また、本発明の抗体またはその機能的断片は、ケモカインの結合によるCCR4レセプターの活性化が関与している病気の治療に用いることができる。例えば、抗体またはその機能的断片（例えば1G1および/または2B10および/または10E4またはその機能的断片）を用いて、アレルギー、アテローム発生、アナフィラキシー、悪性腫瘍、慢性および急性炎症、ヒスタミンおよびIgE媒

介性アレルギー反応、ショック、および慢性関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、多発性硬化症、同種移植片拒絶、線維症、喘息、および炎症性糸球体症を治療することができる。

【0086】

CCR4レセプター機能の阻害物質（抗体またはその好適な断片など）を用いて治療可能な、ヒトまたは他の生物種の病気または症状には以下のものがあるが、それらに限定されない。すなわち：

【0087】

● 喘息、アレルギー性鼻炎、過敏性肺疾患、過敏性肺炎、間質性肺疾患（ILD）（例えば特発性肺線維症、または慢性関節リウマチに関連したILD）、全身性エリテマトーデス、強直性脊椎炎、全身性硬化症、シェーグレン症候群、多発性筋炎または皮膚筋炎）等の呼吸器系統のアレルギー性疾患；アナフィラキシーまたは過敏性反応、（例えばペニシリン、セファロスポリンに対する）薬物アレルギー、昆虫の刺毛アレルギー；クローン病および潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患；脊椎関節症；硬皮症；乾癬、および皮膚炎、湿疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、蕁麻疹のような炎症性皮膚炎；血管炎（例えば壊死性血管炎、皮膚血管炎および過敏性血管炎）を含む、炎症性またはアレルギー性の疾患および症状；

【0088】

● 関節炎（例えば慢性関節リウマチ、乾癬性関節炎）、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、若年性糖尿病、糸球体腎炎等の腎炎、自己免疫性甲状腺炎、ベーチェット病等の自己免疫疾患；

【0089】

● 同種移植片拒絶または移植片対宿主疾患を含む移植片拒絶（例えば臓器移植における）；

【0090】

● アテローム性動脈硬化症；

【0091】

● 皮膚または器官の白血球の浸潤を伴う癌；

【0092】

● 望ましくない炎症反応を阻害することで治療できる他の疾患または症状（CCR4媒介性疾患または症状を含む）には、再灌流障害、ある種の血液学的な悪性腫瘍、サイトカインが誘発する毒性（例えば敗血症性ショック、内毒性ショック）、多発性筋炎、皮膚筋炎、および全身性肉芽腫症を含む肉芽腫性疾患などがあるが、それらに限定されない

【0093】

CCR4レセプター機能のプロモーター（抗体およびその断片を含む）を用いて治療可能な疾患または症状には以下のものがあるが、それらに限定されない：

【0094】

● たとえばAIDSのような免疫不全症候群に罹った個体、免疫抑制を生じる放射線治療、化学治療、自己免疫疾患の治療または他の薬物治療（例えば副腎皮質ホルモン治療）を受けている個体における免疫抑制；およびレセプター機能の先天的な不全または他の原因による免疫抑制。

【0095】

本発明の抗-CRR4抗体は、1種類以上のケモカインの結合をブロックすることができ、その結果、上述の障害をもたらす一つ以上の事象のカスケードの下流をブロックすることができる。

【0096】

投与方法

本発明の一つ以上の抗体または断片は、適当な経路で、単独で、または別の薬物または薬剤と組み合わせて（その投与前に、同時に、または投与後に）、個体に投与することができる。例えば、本発明の抗体は、他のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体と組み合わせて（例えば、CCR3およびCCR5などであるが、これらに限定されない、他のケモカインレセプターに結合する抗体を組み合わせて）、または、予防処置または治療処置に用いる市販のガンマグロブリン製剤および免疫グロブリン製剤のような既存の血液血漿産物と組み合わせて用いることもできる。本発明の抗体または断片は、抗生物質および/または抗菌剤と共に供される、別個に投与される組成物として用いることができる。

【0097】

有効量の抗体または断片（すなわち1種類以上の抗体または断片）が投与される。有効量とは、CCR4機能を阻害し、それによって、炎症反応またはHIV感染を阻害するのに十分な量、または、上述のように、CCR4機能を促進するのに十分な量というように、投薬条件下で、所望の治療効果（予防も含む）を達成するのに十分な量のことである。

【0098】

経口、摂食、局部、非経口（例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、および皮下への注射）、吸入、（例えば、気管支内、眼球内、鼻腔内または経口吸入、点鼻剤）などであり、必ずしもこれらに限定されない、さまざまな投与経路が、治療対象の疾患と症状に応じて可能である。他の適当な投与方法には、再充填可能な、または生分解性のデバイス（devices）や、緩徐放出ポリマーデバイスなどがある。本発明の医薬組成物は、他の薬剤との併用治療の一部として投与することも可能である。

【0099】

投与対象の抗体または断片の処方、選択した投与経路および処方（例えば、溶液、乳濁物、カプセルなど）によって様々である。投与対象の抗体またはその機能的断片を含む、適当な医薬組成物を生理学的に許容できるビヒクル（vehicle）や担体に入れて調製することができる。抗体および/または断片の混合物を用いることもできる。溶液または乳濁物の場合、適当な担体は、例えば、生理食塩水や緩衝化媒体などの、水溶液もしくはアルコール/水溶液、乳濁物もしくは懸濁物などである。非経口的なビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンガーのデキストロース、デキストロース、および塩化ナトリウム、乳酸加リンガーのまたは固定された油などがある。水、緩衝化された水、緩衝化生理食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、デキストロース液、およびグリシンなど、当業者には、さまざまな適当な水性担体が知られている。静脈内ビヒクルとしては、さまざまな添加剤、保存剤、または液剤、栄養素または電解質の補充剤などがある（一般的には、レミントンの薬剤科学、第16版、マック編、1980（Remington's

Pharmaceutical Science, 16th, Edition, Mack, Ed. 1980)を参照)。該組成物は、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、および乳酸ナトリウムなどのpH調節剤、緩衝剤、および毒性調節剤のように、生理的条件に近づけるのに必要な薬学的に許容される補助物質を任意に含むことができる。本発明の抗体および断片は、当技術分野において既知の凍結乾燥および再構成の技術によって、貯蔵するために凍結乾燥し、使用する前に適当な担体中で再構成することができる。選択した媒体中の活性成分の至適濃度は、所望の最終的な薬剤処方に応じて、当業者に公知の手順によって経験的に決定される。吸入の場合には、抗体または断片を可溶化し、適当な投薬用容器（例えば、アトマイザー、ネブライザー、または加圧エアロゾル投薬容器）に入れることができる。

【0100】

ここで、以下の実施例によって、本発明をさらに具体的に説明するが、それらは、本発明の範囲を制限するためのものではない。本明細書において引用されているすべての文献が教示するところは、すべて参照してここに組み込まれる。

【0101】

実施例

材料および方法

CCR4の安定なトランスフェクタントの構築

側方にそれぞれHindIII部位とXbaI部位を含む5'-オリゴヌクレオチドプライマー（5'-CCAACCAAGCTTATGAACCCACGGATATAGCAG-3'；配列番号：1）および3'-オリゴヌクレオチドプライマー（5'-CCAACCTCTAGATTAGAGCATCATGGAATCATGATCC-3'；配列番号：2）を用いたPCRによって、CCR4cDNAを得た。PCR断片をpMRB101のHindIIIおよびXbaI部位にサブクローニングし、挿入した遺伝子をCMVプロモーターによって作動させた。このDNAを、既述されているように（Ponathら、J. Exp. Med. 183:2437（1996）；Wuら、J. Biol. Chem. 271:31202（1996）；Wuら、Nature, 384:179（

1996))、マウスのプレリンバ腫細胞株(L1、2またはL1/2)の中に安定にトランスフェクトした。TARCおよびMDCに対する化学走性能力について、連続希釈/サブクロニングを行なって、CCR4を高レベル発現する細胞を選抜した。モノクローナル抗体を作製するには、細胞を5mMの酪酸で16~18時間処理し、マウスを免疫するために用いた。

【0102】

細胞および細胞株

ポランディアのドナーから静脈血を集め、既述されているように(Ponathら, J. Exp. Med. 183:2437 (1996))、フィコールヒバーク(ficoll-hypaque)密度勾配遠心によってPBMCを単離した。この他に使用した細胞株には、さまざまなケモカインレセプターまたはオープンファンGタンパク質共役型レセプターを発現する、L1、2マウスプレリンバ腫細胞株のトランスフェクタントなどがある。

【0103】

ヒト末梢血を10%(v/v)の0.1M EDTAの中に集めて、1ステップポリモルブ勾配(ニューヨーク州(NY)のアクイレートケミカル社(Accurate Chemical Co.))の上に重層し、室温下、400×gで30分間遠心分離した。好中球および単球の細胞層を集めて、カルシウムおよびマグネシウムを含まないDPBS(ニューヨーク州グランドアイランド(Grand Island, NY)のライフテクノロジーズ社(Life Technologies))に再懸濁して、750×gで15分間遠心分離した。このペレットをE-Lyse(ニューメキシコ州サンタフェ(Santa Fe, NM)のカーディナルアソシエイツ社(Cardinal Associates))に再懸濁して5分間氷上に置いて、赤血球細胞を好中球画分に溶解した。両方の細胞画分を氷冷DPBSで2回洗浄した。10⁷個の単球を5×10⁷細胞/mlで、10⁷単球あたり20μlのCD14Miltenyiビーズ(カリフォルニア州オーバーン(Auburn, CA)のミルテニバイオテック社(Miltenyi Biotech))とともに、PBS、1%BSA、5mM EDTAの中で30分間4℃でインキュベートして、末梢単球からCD14陽性

単球を取り出した。そして、これらをスピンドウニングして、PBS、1%BSA、5mM EDTAで 5×10^7 細胞/mlになるよう再懸濁して、磁界中に置いたVSカラム（カリフォルニア州オーバーン（Auburn, CA）のミルテニイバイオテック社（Miltenyi Biotech））に通して、タギングされていない細胞を除去した。磁界の外で5mlのPBS、1%BSA、5mM EDTAをVSカラムに流して細胞を除去した。この手順を、CD4Miltenyiビーズを用いて繰り返してCD4リンパ球を単離し、化学走性アッセイに用いる前に、10%FCS（ユタ州（Utah）84321のハイクロン社（Hyclone））入りのDMEM、2nMグルタミン、50U/mlペニシリン、50ug/mlストレプトマイシン、1nM MEMビルビン酸ナトリウム、10nM Hepes（すべて、ニューヨーク州14072、グラントアイランド（Grand Island, NY14072）のギブコ（Gibco）BRL社から入手）の中で一晩インキュベートした。

【0104】

慢性的に活性化されているTH1およびTH2リンパ球の調製

6穴の組織培養皿（Falcon3046, ニュージャージー州フランクリンレイクス（Franklin Lakes, NJ）のベクトン・ディキンソン・ラボウェア社（Beckton Dickinson Labware））を10ug/mlの抗-CD28（ベクトン・ディキンソン社（Beckton Dickinson））および2ug/mlのOKT3（バージニア州マナッサス（Manassas, VA）のアメリカンタイプカルチャーコレクション（American Type Culture Collection））によって一晩コートした後、PBSで2回洗浄した。臍帯血のCD4リンパ球（メリーランド州ジャーマンタウン（German Town, MD）のポイエティックシステムズ社（Poietic Systems））を、10%FCS（ユタ州（Utah）のハイクロン社（Hyclone））およびIL-2（4ng/ml）入りのDMEM、2nMグルタミン、50U/mlペニシリン、50ug/mlストレプトマイシン、1nM MEMビルビン酸ナトリウム、10nM Hepes（すべて、ニューヨーク州グラントアイランド（Grand Island, NY14072）のギブコ（Gibco）BRL社から入手）の中で一晩インキュベートした。

nd NY) のギブコ (Gibco) BRL社から入手) の中で、 $10^5 \sim 10^6$ 細胞/ml で培養した。IL-12 (5 ng/ml) および抗-IL-4 (1 mg/ml) を用いて TH1 を誘発する一方、IL-4 (5 ng/ml) および抗-IFN γ (1 μ g/ml) を用いて TH2 を誘発した。4～5日後、活性化された TH1 リンパ球と TH2 リンパ球を一度 DMEM で洗浄してから、10 % FBS および IL-2 (1 ng/ml) 入りの DMEM 中で 4～7 日間培養した。その後、活性化された TH1 リンパ球と TH2 リンパ球を、上記のごとく、抗-CD28/OKT3 および サイトカインによって 5 日間再刺激したが、アポトーシスを防止するために抗-CD95L (1 mg/ml) を加えた。4～5日後、TH1 および TH2 リンパ球を洗浄してから、再び、IL-2 とともに 4 日間培養した。活性化 TH1 および TH2 リンパ球は、このようにして、最大 3 回まで維持した。サイトカインはすべて、R&D システムズ社 (ニューメキシコ州 ミネアポリス (Minneapolis, MN) から入手したが、抗-IL-4、抗-CD95L、および抗-IFN γ はファーマーゲン社 (Pharmingen) (カリフォルニア州 サンディエゴ (San Diego, CA) から入手した。

【0105】

抗-CCR4 モノクローナル抗体の作製、免疫蛍光染色、および FACS (登録商標) 解析

トランスフェクトされた CCR4 を大量に発現する L1、2 細胞でマウスを免疫して、CCR4 と反応する mAb を作製した。6 匹のメスの C57BL/6 マウスを、 10^7 細胞で 2 週間隔で 8～12 回腹腔内から免疫し、CCR4 特異的な mAb を同定するために、融合を 6 回行なった。具体的には、CCR4/L1、2 細胞を静脈内注射してから 4 日後、脾臓を取り出し、既述のごとく (Coliganら、免疫学の最新プロトコル (Current Protocols in Immunology)、ニューヨーク (New York) のジョン・ワイリー・アンド・サンズ社 (John Wiley and Sons))、細胞を SP2/0 細胞株と融合させた。一般的に、一回の融合あたり 3000～5000 個のハイブリドーマをスクリーニングした。6 回の融合のうち 1 回におい

て、抗-CCR4mAbを検出した；このmAbを1G1 (IgG1) と名付けた。さらに7回融合を行なって、2番目の抗-CCR4mAbを検出した；このmAbを2B10 (IgG2a) と呼んだ。また、さらに抗-CCR4mAbを同定し、10E4 (IgG1) と呼んだ。1G1、2B10、および10E4のハイブリドーマは、DMEM、10%ウシ胎仔血清、2mMグルタミン、1mMビルビン酸ナトリウム、および100ng/mlのIL-6、ならびにペニシリン (50ユニット/ml) およびストレプトマイシン (50ug/ml) の中で培養することができる。

【0106】

ケモカインレセプターまたはオーファンGタンパク質共役型レセプターを発現する、様々なL1、2トランスフェクタントに対する反応性に関して、1G1、2B10、および10E4をスクリーニングした。CD4、CD8、CD14、CD20、CD25、CD26、CD69、CD45RO、およびCD45RAに対するPE結合mAbを、ベクトン・ディキンソン社 (Beckton Dickinson) (カリフォルニア州サンノゼ (San Jose, CA)) から入手した。ファーマーミング社 (Pharmingen) (カリフォルニア州ラホヤ (La Jolla, CA)) から、同様のmAb、および抗-CD95 PE、抗-CD3 Cy-Chrome、および抗-CD4 Cy-Chromeの供給を受けた。

【0107】

トランスフェクトされた細胞または白血球に対するmAbの反応性を判定するために、間接免疫蛍光法とフローサイトメトリーを用いた。細胞を一度PBSで洗浄し、5%ヒト血清および0.1%アジ化ナトリウムを含む100μlのPBS (染色用緩衝液)、5μg/ml精製抗体、5μg/ml IgG1アイソタイプに適合した対照mAbのMOPC21 (ミズーリ州セントルイス (St. Louis, MO) のシグマケミカル社 (Sigma Chemical Co.)) または50mlのハイブリドーマ培養上清の中に再懸濁した。4℃に20分間置いた後、染色用緩衝液で細胞を2回洗浄し、FITCに結合した、アフィニティー精製されたF(ab')₂ ヤギ抗マウスIgG (ペンシルバニア州ウエ

ストグループ (West Grove, PA) のジャクソン・イムノリサーチ研究所 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 50ml に再懸濁した。4℃で20分間インキュベートした後、染色用緩衝液で細胞を1回洗浄してから、FACSscan (登録商標) 上で解析して、表面発現量を測定した。

【0108】

組織および免疫組織化学

国立疾患研究交流機関 (National Disease Research Interchange) (NDRI, ペンシルバニア州フィラデルフィア (Philadelphia, PA)) から正常なヒト縦隔リンパ節を入手した。既述の技術 (Silberら, Lab. Invest. 70:163 (1994)) を用い、凍結組織試料に対して、CCR4 についての免疫組織化学的解析を行なった。抗-CCR4 mAb 1G1 (0.3%トリトンX100/0.2%トウイーン20 (Tween 20) /1%FCS/5%ヒトAB血清、0.1%アジ化ナトリウム中10μg/ml) を組織切片の上に適用し、4℃で一晩インキュベートした。アイソタイプが適合する無関係なmAb (MOPC21; ミズーリ州セントルイス (St. Louis, MO) のシグマ社 (Sigma)) を、縦隔節の段階的切片に対し、陰性対照として同じ濃度で用いた。次に、ビオチン化ヤギ抗-マウスIgGおよびアビジン-ビオチン-アルカリホスファターゼ複合体 (カリフォルニア州サンラモン (San Ramon, CA) のバイオジェネックス社 (Biogenex)) を順々に加えた。内因性アルカリホスファターゼ活性をブロックするためにレバミゾールを含むファーストレッド (Fast Red) (カリフォルニア州サンラモン (San Ramon, CA) のバイオジェネックス社 (Biogenex)) を色素原として用い、メイヤーのヘマトキシリンを対比染色に用いた。

【0109】

¹²⁵I-TARC結合

¹²⁵Iで標識したヒトTARCをデュポン・NEN社 (DuPont NEN) (マサチューセッツ州ボストン (Boston, MA)) から購入し、非標識

ケモカインは、ペプロテック社 (Peprotech) (ニュージャージー州ロックビーヒル (Rocky Hill, NJ)) または R&D システムズ社 (ニューメキシコ州ミネアポリス (Minneapolis, MN)) から購入した。標的細胞へのケモカインの結合は、以下の手順で行なった: CCR4/L1.2 細胞を洗浄して、結合用緩衝液 (50 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , および 0.5 % BSA) に 10^7 /ml となるよう再懸濁した。各結合反応液 (最終容量 100 μ l) について、25 μ l の細胞懸濁液 (2.5×10^5 細胞) を、適当な量の抗-CCR4 の mAb、またはアイソタイプが適合する対照 mAb とともに、またはそれを入れずに、0.1 nM の放射性標識ケモカインと混合した。全結合は、放射性標識ケモカインのみ存在するところで測定し、非特異的結合 (バックグラウンド) は、100 nM の非標識ケモカイン存在下で測定した。反応液を室温で 45 ~ 60 分間インキュベートし、混合液を GFB フィルタープレートに移して停止させ、次に、0.5 M NaCl を含む結合用緩衝液で 2 ~ 3 回洗浄した。プレートを乾燥させ、計測する前にマイクロセイント (MicroSeint) シンチレーション液を加えた。各試料は反復して測定した。結果を図 5 に示す。2B10 の IC_{50} 値は、約 1 ng/ml であり、1G1 の IC_{50} 値は約 1 μ g/ml であった (カレイダグラフソフトウェア (Kaleidagraph software))。

【0110】

化学走性アッセイ

CCR4/L1.2 トランスフェクタント細胞およびピア (Peer) 細胞株を用いた化学走性を、以前の記載にしたがって行なった (Wuら, J. Biol. Chem. 271:31202 (1996); Wuら, J. Exp. Med. 186:1373 (1997))。簡単にいうと、コストア社 (Costar, マサチューセッツ州) から入手した 3 mm 口径のトランスウエルインサートを用いた。0.5 ml の RPMI、0.5 % BSA、10 mM HEPES 中 100 ng/ml になるようケモカインを下方のウエルに加えた。調査中の細胞を RPMI で洗浄して RPMI、0.5 % BSA および 10 mM HEPES 中で 4×10^5 細胞/ml となるよう再懸濁した。場合によっては、mAb を細胞懸濁液

に $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるまで加え、 4°C で 10 分間結合させた。 $200 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液のアリコート (aliquot) (2×10^6 個の細胞投入) を各インサートに加えた。 $5\% \text{CO}_2$ インキュベーター内に 3°C で $2 \sim 4$ 時間置いた後、インサートをプレートから外した。トランスウエルの底部チャンバーに遊走した細胞を、FACSscan (登録商標) を用いて 30 秒間、細胞を数えて数量化した。フォワードアングル (Forward angle) とサイドスキャッターゲート (side scatter gates) を、細胞残さまたは無関係な細胞を排出させるために設けた。MDC および TARC に対する化学走性の 1G 阻害の IC_{50} 値は約 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

【0111】

結果

CCR4 は、T 細胞上で発現する、TARC および MDC によって特異的に活性化されるケモカインレセプターである。CCR4 の発現と機能をさらに調べるため、ヒト CCR4 レセプターに対するモノクローナル抗体 ($1\text{G}1$, $2\text{B}10$ および $10\text{E}4$) を作製した。モノクローナル抗体 $1\text{G}1$ は、CCR4/L1、2 トランスフェクタントを染色するが、他のケモカインレセプターやオーファン G タンパク質共役型レセプターを発現する 20 種類以上の異なる L1、2 トランスフェクタントのパネルは染色しなかった (図 1)。モノクローナル抗体 $2\text{B}10$ は、L1、2 CCR4 トランスフェクタントと反応するが、これまでに調べた別の 2 種類のケモカインレセプタートランスフェクタントと反応しなかった。モノクローナル抗体 (mAb) $1\text{G}1$ は、 $\text{CD}4$ + 末梢血リンパ球の約 15% を染色するが、 $\text{CD}8$ + T リンパ球を染色することはほとんどない (図 2 と 3)。CCR4 は、活性化メモリー T 細胞のサブセット上で発現しており；ほとんどの $\text{CLA} + / \alpha 4\beta 7$ - 上で発現しているが、 $\text{CLA} - / \alpha 4\beta 7$ + 細胞上では発現しない。より具体的には、mAb $1\text{G}1$ は、インビトロ由来の $\text{T}h2$ を特異的に染色するが、 $\text{T}h1$ 細胞は染色しない。一方、CXCR3 は、ほとんどの $\text{T}h1$ 上で発現しているが、 $\text{T}h2$ 細胞では発現しない。CCR2 はどちらの細胞型でも発現している (図 4)。さらに、予備的な免疫組織化学実験では、CCR4 が、ヒトの扁桃腺およびいくつか別の組織における T 細胞のサブセット、マクロ

ファージ、および内皮で検出されることが示されている。mAb 1G1は、¹²
⁶ I 標識 TARC が CCR4/L1・2 トランスフェクタントに結合するのを阻害し(図5)、また、これらの細胞の TARC および MDC に対する化学走性も阻害する(図6A~6D、7A~7B、8、9および10)。

【0112】

モノクローナル抗体 2B10 は、L1・2 CCR4 トランスフェクタントを染色するが、L1・2 の親細胞株や、別の2種類のケモカインレセプタートランスフェクタント (gpr-9-6 と V28) は染色しないと認められた。1G1 と合わせて考えてみると、2B10 は、末梢 CD4 リンパ球の約 15% のサブセットを染色するが、CD8 リンパ球はほとんど染色しないことが分かった。CD19 リンパ球および NK 細胞は、2B10 では染色されなかった。2B10 で染色された CD4 リンパ球は、CD45RO の発現によって区別したところ、メモリー CD4 リンパ球のサブセットであった。1G1 と合わせて考えてみると、2B10 は、インビトロ由来の Th2 リンパ球と選択的に反応して、インビトロ由来の Th1 リンパ球とは反応しないことが分かった。化学走性アッセイにおいて、2B10 は、末梢血 CD4 リンパ球とインビトロ由来の Th2 リンパ球の TARC および MDC に対する化学走性を有意にブロックした。全体的に見て、10E4 が、もっとも優れたブロッキングを行なう抗-CCR4 モノクローナル抗体であり、次が 2B10、その次が 1G1 であることが明らかとなった(図10A と 10B)。これらをまとめた結果は、CCR4 およびそのリガンドが、Th2 媒介性炎症反応および皮膚では重要な役割を果たしているが、粘膜、T リンパ球のホーミングでは、重要な役割は果たしていない可能性を示唆している。

【0113】

本発明は、その好ましい実施態様を挙げながら、具体的に説明されているが、添付の特許請求の範囲によって規定される発明の精神と範囲を逸脱することなく、その形状や細部にさまざまな変更を加えることができることは、当業者の理解しているところである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> LeukoSite, Inc.
 Wu, Lijun
 Ruffing, Nancy
 Andrew, David

<120> Anti-CCR4 ANTIBODIES AND METHODS OF USE
 THEREFOR

<130> 1855.1063002 PCT

<150> 09/231,759

<151> 1999-01-15

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer

<400> 1

ccaacacagc ttatgaaccc caggatata gcag

34

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer

<400> 2

ccaacacctta gattagagca tcatggagat catgatcc

38

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、様々なL1、2トランスフェクタントのmAb 1G1染色を示すFACSscan（登録商標）プロファイルである。異なるケモカインレセプターCCR1〜CCR8を発現させる安定L1、2トランスフェクタントを抗-CCR4 mAb 1G1で染色した。陰性対照染色はどのL1、2トランスフェクタントについてもCCR1/L1、2細胞の染色と似ていた。

【図2】

図2は、末梢血リンパ球の様々な集団でのCCR4発現を示すFACSscan（登録商標）ドットプロットである。2色染色プロトコールにより、mAb 1G1（全てのプロットでx軸）と、細胞マーカー（全てのプロットでy軸）CD14（単球）、CD4とCD8（T細胞）、CD16とCD56（NK細胞）およびCD19とCD20（B細胞）とを使って、CCR4の発現を評価した。各プロットにサブセットマーカーを表示する。各象現は対照mAbの染色に従って

設定した。染色は解析したドナーを示す。

【図3】

図3は、CD4+T細胞でのCCR4発現を示すFACSscan（登録商標）ドットプロットである。3色染色プロトコールを使って、CD4+T細胞でのCCR4（全てのプロットでx軸）とT細胞サブセットマーカー（全てのプロットでy軸）の発現を評価した。各プロットにサブセットマーカーを表示する。各象現は対照mAbの染色に従って設定した。染色は解析した複数のドナーを示す。CD4+リンパ球にゲートをかけ、CCR4対様々な細胞マーカーをグラフに表示することによって細胞を解析した。各象現は対照mAbの染色に従って設定した。メモリー/ナイーブ（naive）マーカー：CD45RO、CD45RA。セレクトリン/リガンド：CLA、P-セレクトリンリガンド、E-セレクトリンリガンド、L-セレクトリン。インテグリン：ACT-1（ $\alpha 4 \beta 7$ ）、CD49d（ $\alpha 4$ ）、インテグリン $\beta 7$ 、CD29（ $\beta 1$ ）、CD104（ $\beta 4$ ）およびCD103（ αe ）。mAb 2B10によるCCR4染色は同じ染色パターンを示す。

【図4】

図4は、Th2細胞でのCCR4の発現を示すFACSscan（登録商標）プロフィールである。臍帯血CD4リンパ球から2サイクルの活性化によって産生した慢性的活性化Th1リンパ球（線）と慢性的活性化Th2リンパ球（塗り潰した部分）を陽性対照として抗 $\alpha 4 \beta 7$ mAb Act1で染色した。このインテグリンはTh1リンパ球とTh2リンパ球の両方に発現するからである。抗CCR2 mAb 1D9による染色はTh1およびTh2 mAbがどちらもCCR2を発現することを示し、抗-CXCR3 mAb（R&D、ミネソタ州ミネアポリス）による染色はCXCR3がインビトロ誘導Th1細胞に選択的に発現されることを示した。1G1を使用することにより、CCR4はTh2リンパ球に選択的に発現することを見出した。

【図5】

図5は、mAb 1G1および2B10がCCR4/L1、2トランスフェクタントに対する¹²⁵I-TARCの結合を阻害することを示すグラフである。C

CCR4/L1. 2細胞をある用量範囲のmAb 1G1、mAb 2B10またはMOPC21 (IgG1イソタイプ対照) の存在下(総結合量)または存在下(競合結合量)で0.1nMの¹²⁵I-TARCと共にインキュベートした。60分後に過剰の抗体とケモカインを洗い流し、反応液をカウントした。示されたデータは、総結合量に対する阻害パーセントである。

【図6】

図6A-6Dは、TARCおよびMDCに対するCCR4/L. 12化学走性のmAb 1G1による阻害を示すグラフである。トランスウェル化学走性アッセイにおいてCCR4/L1. 2細胞をmAb 1G1またはmAb MOPC21 (イソタイプ対照) の存在下または不在下でTARCまたはMDCに向かって走化させた。図6Aおよび6Bではある濃度範囲のケモカインを20μg/mlのmAb 1G1およびMOPC21と共に使用した。図6Cおよび6Dでは5nMのケモカインをある濃度範囲の1G1およびMOPC21と共に使用した。移動した細胞数は前方散乱と側方散乱を用いてフローサイトメトリーによってカウントした。

【図7】

図7A-7Bは、TARC (図7A) およびMDC (図7B) に対するPee r細胞 (ヒトデルタ・ガンマT細胞レセプター株) 化学走性のmAb 1G1による阻害を示すグラフである。トランスウェル化学走性アッセイにおいてPee r細胞をmAb 1G1の存在下または不在下でTARCまたはMDCに向かって走化させた。ある濃度範囲のTARCまたはMDCを50μg/mlの抗CCR4 mAb 1G1およびmAb MOPC21 (イソタイプ対照) と共に使用した。移動した細胞数は前方散乱と側方散乱を用いてフローサイトメトリーによってカウントした。

【図8】

図8は、Th2の移動に対する抗CCR4 mAb 1G1および2B10の効果を示す。慢性活性化Th1/Th2を脾臓血CD4リンパ球から2サイクルの活性化によって産生し、50μg/mlのIgG1対照mAb、抗CCR4 mAb 1G1または抗CCR4 mAb 2B10と共にプレインキュ

ペートした。氷上で10分の後、Th2細胞を100 ng/mlのMDC、TARCまたはRANTESに向かって2時間移動させた。ある場合は、MDCをMDCに対するウサギポリクローナルと共に10分間ブレインキュベートしてから使用した(MDC/—MDC)。バックグラウンドの移動を確定するために、下部ウェルにケモカインを使用しなかった(—)。この時間の後、下部ウェルに蓄積された細胞をFACSCANを用いてカウントした。

【図9】

図9は、24時間齢のCD4リンパ球の移動に対する抗-CCR4 mAb 1G1および2B10の効果を示す。24時間齢のCD4リンパ球を50 µg/mlの対照mAb、抗-CCR4 mAb 1G1または抗-CCR4 mAb 2B10と共にブレインキュベートした。氷上で10分の後、そのCD4リンパ球を100 ng/mlのMDC、TARCまたはRANTESに向かって2時間移動させた。ある場合は、MDCをMDCに対するウサギポリクローナルと共に10分間ブレインキュベートしてから使用した(MDC/—MDC)。バックグラウンドの移動を確定するために、下部ウェルにケモカインを使用しなかった(—)。この時間の後、下部ウェルに蓄積した細胞をFACSCANを用いてカウントした。

【図10】

図10Aと10Bは、MDCとTARCに対するL1.2/CCR4トランスフェクタントの移動をモノクローナル抗体10E4、2B10および1G1がブロックすることを示すグラフである。L1.2/CCR4トランスフェクタント(2×10^6 細胞/ml RPMI、0.5%ウシ血清アルブミン、10 mM HEPES)を様々な濃度の精製抗-CCR4モノクローナル抗体10E4(1G1)、2B10(1G2a)および1G1(1G1)と共に氷上で10分間前処理し、次に各200 µlの細胞のアリコートにCostar 3.0 µm トランスウェルフィルター(Costar、マサチューセッツ州ケンブリッジ)を使った化学走性アッセイに使用して、50 ng/mlのMDC(図10A)または100 ng/mlのTARC(図10B)に向かって定化させた。次にBecton DickinsonのFACSCANで細胞をカウントした。1

0E4が最もよいブロッキング抗-CCR4モノクローナル抗体であり、2B10がこれに続き、1G1はその次であることがわかった。IgG1対照モノクローナル抗体はL1. 2/CCR4トランスフェクタントのMDC (315 ± 30) またはTARC (382 ± 11) への移動に対して何の効果も持たなかった。

【図1】

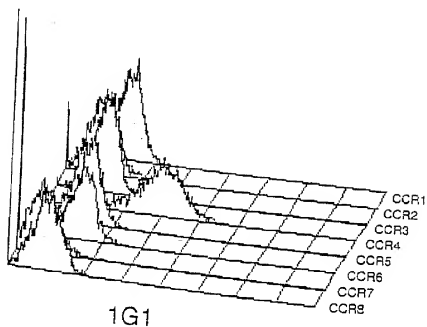


Fig. 1

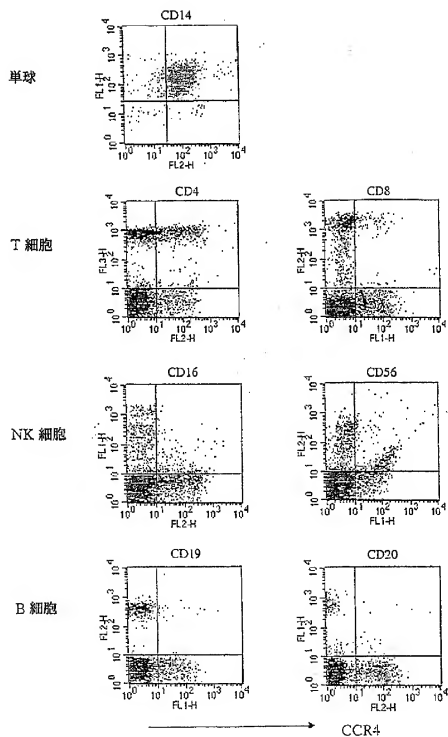


FIG. 2

【図3】

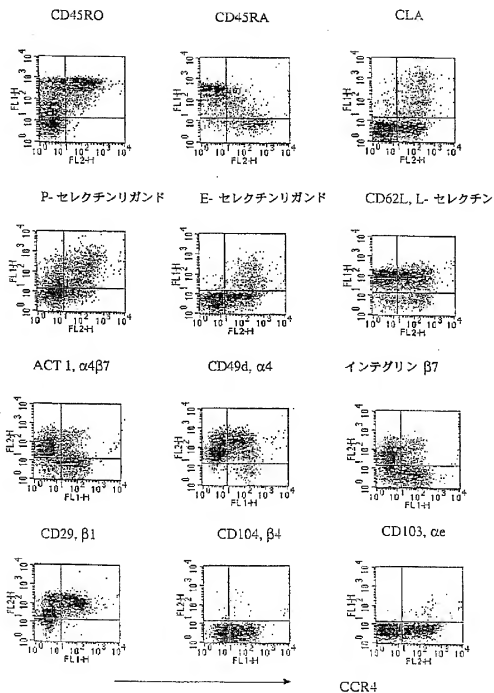


FIG. 3

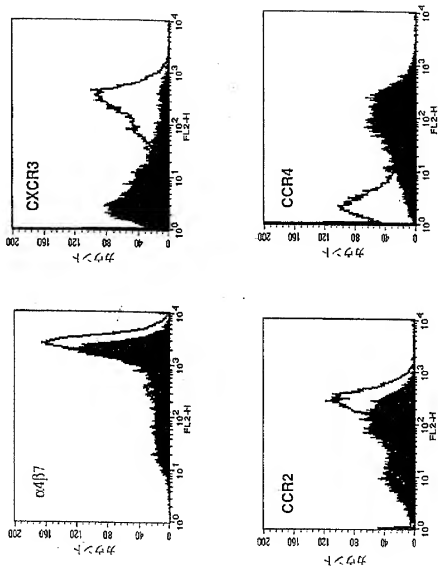


FIG. 4

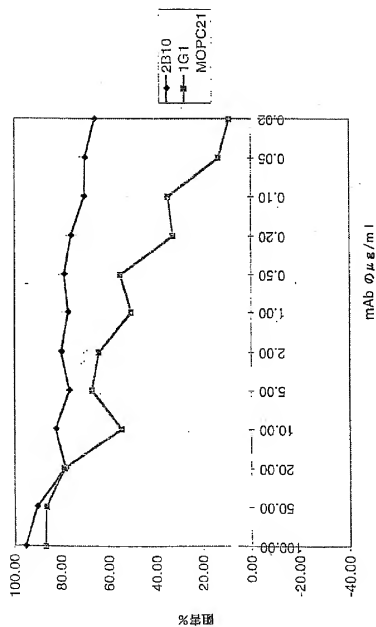


FIG. 5

TARC 化学走査

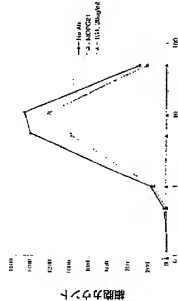


Fig. 6A

MDC 化学走査

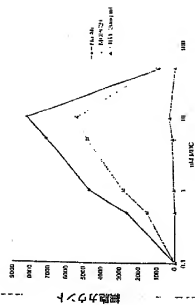


Fig. 6B

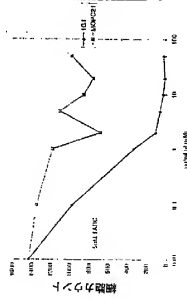


Fig. 6C

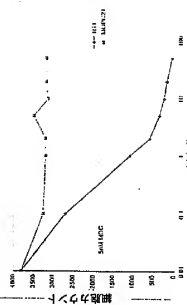


Fig. 6D

TATC 化学走性

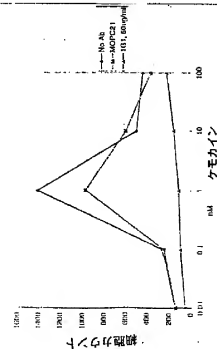


Fig. 7A

MDC 化学走性

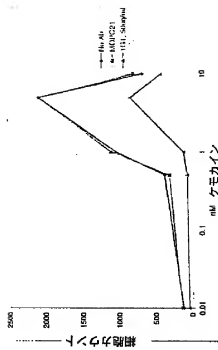


Fig. 7B

【図 8】

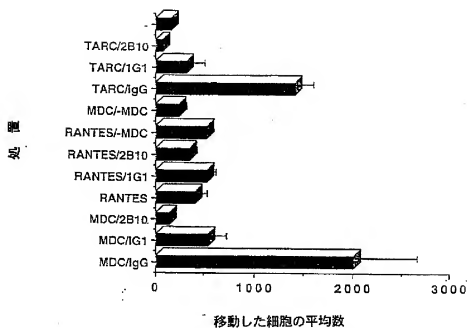


FIG. 8

【図 9】

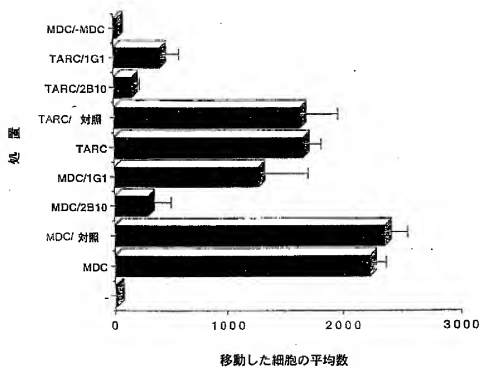


FIG. 9

抗-CCR4 mAb による MDC への L1.2 CCR4
トランスフェクタント化学誘性の阻害

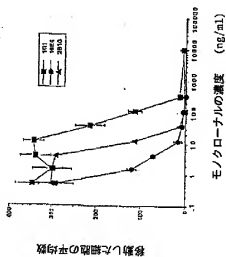


Fig. 10A

抗-CCR4 mAb による TMEC への L1.2 CCR4
トランスフェクタント化学誘性の阻害

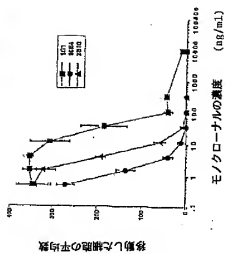


Fig. 10B

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年1月12日(2001. 1. 12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項7】 ATCC登録番号HB-12624の下に寄託された1G1ハイブリドーマ細胞株。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項8】 ATCC登録番号HB-12625の下に寄託された2B10ハイブリドーマ細胞株。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項44

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項44】 ATCC登録番号PTA-1203の下に寄託された10E4ハイブリドーマ細胞株。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

本発明の抗体を産生するネズミハイブリドーマ細胞株は、1999年1月5日にLeukoSite, Inc., 215 First Street, Cambridge, MA 02142, U. S. A. を代表してアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection), 10801, University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, U. S. A. に、登録番号HB-12624 (LS141-1G1-65-15-1 (1G1)) およびHB-12625 (LS185-2B10-4-1 (2B10)) で寄託された。本発明のさらなる抗体を産生するネズミハイブリドーマ細胞株は、2000年1月14日にLeukoSite, Inc., 215 First Street, Cambridge, MA 02142, U. S. A. を代表してアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, 10801, University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, U. S. A. に、登録番号PTA-1203 (LS257-10E4. 1. 1 (10E4)) で寄託された。本発明はまた、ATCC登録番号HB-12624、ATCC登録番号HB-12625、およびATCC登録番号PTA-1203の下で寄託されたハイブリマ細胞株、ならびにATCC登録番号HB-12624、HB-12625およびATCC登録番号PTA-1203の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生されるモノクローナル抗体に関する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

また本発明は、ATCC登録番号HB-12624、HB-12625およびPTA-1203の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株ならびにATCC登録番号HB-12624、HB-12625およびPTA-1203の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体に関する。本

発明の細胞株はモノクローナル抗体の産生の他にも用途を有する。例えば、本発明の細胞株をさらなるハイブリドーマを作製するために、他の細胞（適当な薬剤標識された（drug-marked）ヒトの骨髓腫、マウスの骨髓腫、ヒトマウスヘテロ骨髓腫またはヒトのリンパ芽球細胞など）と融合させて、モノクローナル抗体をコードする遺伝子の伝達を提供することができる。またこれらの細胞株は抗-CCR4免疫グロブリン鎖をコードする核酸の供給源として使用することもできる。これは、単離し、発現させることができる（例えば任意の適切な技術を使って他の細胞に移入したとき、例えばCabillyら、米国特許第4,816,567号;Winter、米国特許第5,225,539号を参照されたい）。例えば、再配列された抗-CCR4軽鎖または重鎖を含むクローンは（例えばPCRによって）単離され得るか、またはこれらの細胞株から単離されるmRNAからcDNAライブラリーを作成して抗-CCR4免疫グロブリン鎖をコードするcDNAクローンを単離され得る。したがって、特異的な免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのバリエーション（例えばヒト化免疫グロブリン）を様々な宿主細胞中またはインビトロ翻訳系中で産生するために、抗体またはその一部の重鎖および/または軽鎖をコードする核酸を組換えDNA技術に従って取得し使用することができる。例えば、核酸（cDNA、またはヒト化免疫グロブリンもしくは免疫グロブリン鎖などのバリエーションをコードするその誘導体を含む）は、適切な原核生物または真核生物ベクター（例えば発現ベクター）中に配置され得る。これを適切な宿主細胞中に適当な方法（例えば形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、感染など）によって導入することができる。その結果、核酸が（例えばベクター中または宿主細胞のゲノム中に組み込まれた）1つ以上の発現制御因子に作動可能な形で連結される。産生のためには、宿主細胞を発現に適した条件下に（例えば誘導物質、適当な塩類が補足された適切な培地、成長因子、抗生物質、栄養補充剤の存在下）に維持することができ、それによりコードされたポリペプチドが産生される。所望であれば、コードされたタンパク質を（例えば、宿主細胞、培地、乳から）回収および/または単離し得る。この産生方法にトランスジェニック動物の宿主細胞中での発現が包含されることは理解されるだろう（例えば、1992年3月19日に公開された国

際公開第92/03918号, GenPharm International を参照されたい)。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、様々なL1、2トランスフェクタントのmAb 1G1染色を示すFACSscan (登録商標) プロフィールである。異なるケモカインレセプターCCR1~CCR8を発現させる安定L1、2トランスフェクタントを抗CCR4 mAb 1G1で染色した。陰性対照染色はどのL1、2トランスフェクタントについてもCCR1/L1、2細胞の染色と似ていた。

【図2】

図2A~2Bは、末梢血リンパ球の様々な集団でのCCR4発現を示すFACSscan (登録商標) ドットプロットである。2色染色プロトコールにより、mAb 1G1 (全てのプロットでx軸) と、細胞マーカー (全てのプロットでy軸) CD14 (単球)、CD4とCD8 (T細胞)、CD16とCD56 (NK細胞) およびCD19とCD20 (B細胞) とを使って、CCR4の発現を評価した。各プロットにサブセットマーカーを表示する。各象現は対照mAbの染色に従って設定した。染色は解析したドナーを示す。

【図3】

図3A~3Dは、CD4+T細胞でのCCR4発現を示すFACSscan (登録商標) ドットプロットである。3色染色プロトコールを使って、CD4+T細胞でのCCR4 (全てのプロットでx軸) とT細胞サブセットマーカー (全てのプロットでy軸) の発現を評価した。各プロットにサブセットマーカーを表示する。各象現は対照mAbの染色に従って設定した。染色は解析した複数のドナーを示す。CD4+リンパ球にゲートをかけ、CCR4対様々な細胞マーカーをグ

ラフに表すことによって細胞を解析した。各象現は対照mAbの染色に従って設定した。メモリー/ナイーブ (naive) マーカー: CD45RO、CD45RA、セレクトリン/リガンド: CLA、P-セレクトリンリガンド、E-セレクトリンリガンド、L-セレクトリン。インテグリン: ACT-1 ($\alpha 4 \beta 7$)、CD49d ($\alpha 4$)、インテグリン $\beta 7$ 、CD29 ($\beta 1$)、CD104 ($\beta 4$) および CD103 (αe)。mAb 2B10によるCCR4染色は同じ染色パターンを示す。

【図4】

図4は、Th2細胞でのCCR4の発現を示すFACSscan (登録商標) プロフィールである。臍帯血CD4リンパ球から2サイクルの活性化によって産生した慢性活性化Th1リンパ球 (線) と慢性活性化Th2リンパ球 (塗り潰した部分) を陽性対照として抗 $\alpha 4 \beta 7$ mAb Act1で染色した。このインテグリンはTh1リンパ球とTh2リンパ球の両方に発現するからである。抗CCR2 mAb 1D9による染色はTh1およびTh2 mAbがどちらもCCR2を発現することを示し、抗CXCR3 mAb (R&D、ミネソタ州ミネアポリス) による染色はCXCR3がインビトロ誘導Th1細胞に選択的に発現されることを示した。1G1を使用することにより、CCR4はTh2リンパ球に選択的に発現することを見出した。

【図5】

図5は、mAb 1G1および2B10がCCR4/L1、2トランスフェクタントに対する¹²⁵I-TARCの結合を阻害することを示すグラフである。CCR4/L1、2細胞をある用量範囲のmAb 1G1、mAb 2B10またはMOPC21 (1G1イソタイプ対照) の存在下 (総結合量) または存在下 (競合結合量) で0.1 nMの¹²⁵I-TARCと共にインキュベートした。60分後に過剰の抗体とケモカインを洗い流し、反応液をカウントした。示されたデータは、総結合量に対する阻害パーセントである。

【図6】

図6A-6Dは、TARCおよびMDCに対するCCR4/L1、2化学走性のmAb 1G1による阻害を示すグラフである。トランスウェル化学走性アッ

セイにおいてCCR4/L1、2細胞をmAb 1G1またはmAb MOPC 21（イソタイプ対照）の存在下または不在下でTARCまたはMDCに向かって走化させた。図6Aおよび6Bではある濃度範囲のケモカインを $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のmAb 1G1およびMOPC 21と共に使用した。図6Cおよび6Dでは 5nM のケモカインをある濃度範囲の1G1およびMOPC 21と共に使用した。移動した細胞数は前方散乱と側方散乱を用いてフローサイトメトリーによってカウントした。

【図7】

図7A-7Bは、TARC（図7A）およびMDC（図7B）に対するPeer細胞（ヒトデルタ・ガンマT細胞レセプター株）化学走性のmAb 1G1による阻害を示すグラフである。トランスウェル化学走性アッセイにおいてPeer細胞をmAb 1G1の存在下または不在下でTARCまたはMDCに向かって走化させた。ある濃度範囲のTARCまたはMDCを $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗-CCR4 mAb 1G1およびmAb MOPC 21（イソタイプ対照）と共に使用した。移動した細胞数は前方散乱と側方散乱を用いてフローサイトメトリーによってカウントした。

【図8】

図8は、Th2の移動に対する抗-CCR4 mAb 1G1および2B10の効果を示す。慢性活性化Th1/Th2を脾臓血CD4リンパ球から2サイトの活性化によって産生し、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG1対照mAb、抗-CCR4 mAb 1G1または抗-CCR4 mAb 2B10と共にブレインキュベートした。氷上で10分の後、Th2細胞を $100\text{ng}/\text{ml}$ のMDC、TARCまたはRANTESに向かって2時間移動させた。ある場合は、MDCをMDCに対するウサギポリクローナルと共に10分間ブレインキュベートしてから使用した（MDC/—MDC）。バックグラウンドの移動を確定するために、下部ウェルにケモカインを使用しなかった（—）。この時間の後、下部ウェルに蓄積された細胞をFACSCANを用いてカウントした。

【図9】

図9は、24時間齢のCD4リンパ球の移動に対する抗-CCR4 mAb

1G1および2B10の効果を示す。24時間経のCD4リンパ球を $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の対照mAb、抗-CCR4 mAb 1G1または抗-CCR4 mAb 2B10と共にブレインキュベートした。氷上で10分の後、そのCD4リンパ球を $100\text{ng}/\text{ml}$ のMDC、TARCまたはRANTESに向かって2時間移動させた。ある場合は、MDCをMDCに対するウサギポリクローナルと共に10分間ブレインキュベートしてから使用した(MDC/−MDC)。バックグラウンドの移動を確定するために、下部ウェルにケモカインを使用しなかった(−)。この時間の後、下部ウェルに蓄積した細胞をFACSCANを用いてカウントした。

【図10】

図10Aと10Bは、MDCとTARCに対するL1. 2/CCR4トランスフェクタントの移動をモノクローナル抗体10E4、2B10および1G1がブロックすることを示すグラフである。L1. 2/CCR4トランスフェクタント(2×10^6 細胞/ ml RPMI、0. 5%ウシ血清アルブミン、10mM HEPES)を様々な濃度の精製抗-CCR4モノクローナル抗体10E4 (1G1)、2B10 (1G2a) および1G1 (1G1) と共に氷上で10分間前処理し、次に各 $200\mu\text{l}$ の細胞のアリコートにCostar 3. 0μM トランスウェルフィルター(Costar、マサチューセッツ州ケンブリッジ)を使った化学走性アッセイに使用して、 $50\text{ng}/\text{ml}$ のMDC(図10A)または $100\text{ng}/\text{ml}$ のTARC(図10B)に向かって走化させた。次にBecton DickinsonのFACSCANで細胞をカウントした。10E4が最もよいブロック抗-CCR4モノクローナル抗体であり、2B10がこれに続き、1G1はその次であることがわかった。1G1対照モノクローナル抗体はL1. 2/CCR4トランスフェクタントのMDC(315 ± 30)またはTARC(382 ± 11)への移動に対して何の効果も持たなかった。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/28 C12N5/20 001N33/577 001N33/68 A61K39/395		International Application No. PCT/US 00/00917
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	P. PONATH: "Chemokine receptor antagonists: novel therapeutics for inflammation and AIDS." EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS, vol. 7, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 1-18, XP000597254 London, GB page 7, left-hand column, line 1 - page 8, right-hand column, line 20 -/-	1-45
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are cited in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being disclosed in a patent cited in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 May 2000		Date of mailing of the international search report 13/06/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2018, Friesenheim 2 74111, 74111 Friesenheim Tel. (+49-714) 940-1040, Fax (+49-714) 940-1010		Authorized officer No01J, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No.
PCT/US 00/00917

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. DÜRIG ET AL.: "Expression of macrophage inflammatory protein-1 alpha receptors in human CD34+ hematopoietic cells and their modulation by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma." BLOOD, vol. 92, no. 9, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 3073-3081, XP000867033 New York, NY, USA abstract	1-45
A	WO 98 27815 A (MERCK & CO., INC.) 2 July 1998 (1998-07-02) page 18, line 16 - line 35	1-45
A	H. YONEYAMA ET AL.: "Pivotal role of TARC, a CC chemokine, in bacteria-induced fulminant hepatic failure in mice." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 102, no. 11, December 1998 (1998-12), pages 1933-1941, XP000867034 USA abstract	1-45
A	B. WU ET AL.: "Interaction of chemokine receptor CXCR5 with its ligands: Multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 186, no. 8, 20 October 1997 (1997-10-20), pages 1373-1381, XP002060734 New York, NY, USA abstract	1-45
A	H. HEATH ET AL.: "Chemokine receptor usage by human eosinophils." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 99, no. 2, January 1997 (1997-01), pages 178-184, XP002056312 USA abstract	1-45

-/-

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No.
PCT/US 00/00917

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	J. CAMPBELL ET AL.: "The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells." NATURE, vol. 400, no. 6746, 19 August 1999 (1999-08-19), pages 776-780, XP002138298 London, GB figure 1E page 780, left-hand column, line 27 - line 36	1-12, 19-24, 28-34
P,X	DATABASE WPI Week 9952 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1999-603709 XP002138299 & JP 11 243960 A (SHIONOGI & CO. LTD.), 14 September 1999 (1999-09-14) abstract	1-45
P,X	WO 99 15666 A (ICOS CORPORATION) 1 April 1999 (1999-04-01) page 25, line 27 claim 37	1-45

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

page 3 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 00/00917

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ **Claims Not:**
because they relate to subject matter not required to be searched by the Authority, namely:
Although claims 13-18, 25-27 (all partially, as far as an in vivo method is concerned) and claims 35-38, 42 and 43 (all completely) are directed to a treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ **Claims Not:**
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ **Claims Not:**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Not:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Not:

Remark on Protest:

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCTISA/210 (continuation of first sheet) (11) (July 1998)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 13-18, 25-27 (all partially, as far as an in vivo method is concerned) and claims 35-38, 42, and 43 (all completely) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 00/00917

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9827815	A	02-07-1998	AU 5812498 A US 5919776 A	17-07-1998 06-07-1999
JP 11243960	A	14-09-1999	NONE	
WO 9915666	A	01-04-1999	US 5932703 A AU 9777898 A AU 738743 B AU 6172496 A BR 9606437 A CA 2196591 A CZ 9700293 A EP 0778892 A FI 970502 A HU 9701282 A JP 10507646 T NO 970545 A PL 318594 A SK 16497 A WO 9640923 A	03-08-1999 12-04-1999 12-08-1999 30-12-1996 30-09-1997 19-12-1996 14-01-1998 18-06-1997 04-04-1997 28-10-1997 28-07-1998 07-04-1997 23-06-1997 06-05-1998 19-12-1996

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/532	
G 0 1 N 33/532		33/566	
33/566		33/577	B
33/577		C 1 2 P 21/08	
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 5/00	B
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	アンドリュウ, デビッド		
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ		
	02451 ウォールサム, ナンバー1628, ブ		
	ラック ベア ドライブ 85		
Fターム(参考)	4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01		
	DA13		
	4B065 AA92X AB05 BA08 CA25		
	CA44 CA46		
	4C085 AA14 AA16 BB31 BB41 BB43		
	CC02 CC22 CC23 EE01 GG01		
	GG02 GG03 GG04 GG08 GG10		
	4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA22		
	EA54 FA72 FA74		